MANUAL
PATOLOGÍA CLÍNICA EN SALMÓNIDOS

SEGUNDA EDICIÓN

EDITADO POR
MARCO A. ROZAS-SERRI

2020

Proyecto financiado por

PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA

Ejecutado por

pathovet® LABORATORIO

Universidad Austral de Chile
Campus Patagonia

Patrocinado por

SalmonChile

SERNAPESCA
Ministerio de Economía, Fomento y Turismo
Gobierno de Chile

Auspiciado por*

Elanco™

* El contenido de este Manual es de completa responsabilidad de Pathovet y no se relaciona en forma alguna con la opinión o productos de Elanco.

COLABORADORES

Romina Y. Walker-Vergara, DVM, MSc, Laboratorio Pathovet, Puerto Montt, Chile

Ananda Müller, DVM, MSc, PhD, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

Verónica C. Arnés, TM, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

Victoria F.D. Jaramillo, DVM, Laboratorio Pathovet, Puerto Montt, Chile

Ricardo S. Ildefonso, DVM, TM, Laboratorio Pathovet, Puerto Montt, Chile

EDITOR

Marco A. Rozas-Serri es Médico Veterinario, Magíster en Ciencias Veterinarias (patología de peces) y Doctor en Ciencias Veterinarias (patología e inmunología de peces). Fundador de Laboratorio Pathovet y Newenko Group en Chile, empresas biotecnológicas proveedoras de la industria del salmón.

Contenidos

Página

PRÓLOGO 5

M.A. Rozas-Serri

CAPÍTULO 1 10

Toma de muestras de sangre

V.F.D. Jaramillo, R.S. Ildefonso & M.A. Rozas-Serri

CAPÍTULO 2 20

Hematología en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara, V.C. Arnés, A. Müller, R.S. Ildefonso & M.A. Rozas-Serri

CAPÍTULO 3 36

Bioquímica sanguínea en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara, V.C. Arnés, A. Müller & M.A. Rozas-Serri

CAPÍTULO 4 44

Gasometría sanguínea en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara & M.A. Rozas-Serri

CAPÍTULO 5 50

Endocrinología en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara & M.A. Rozas-Serri

REFERENCIAS 58

ANEXOS 60

Prólogo

M.A. Rozas-Serri

La patología clínica veterinaria es una especialidad de la medicina veterinaria que se dedica al apoyo diagnóstico utilizando pruebas de laboratorio en la sangre y otros fluidos corporales de animales, incluido peces, proporcionando indicadores necesarios para la toma de decisiones en el plan diagnóstico, tratamiento, control y pronóstico de la población de animales en cultivo.

La sangre es un tejido constituido por una matriz líquida denominada plasma, en la cual se encuentran células en suspensión y proteínas, glucosa, iones, minerales, hormonas y dióxido de carbono en solución. La sangre se distribuye en todos los tejidos y órganos del organismo a través del sistema vascular, por lo que la presencia o ausencia de componentes específicos de los tejidos en la sangre permite determinar potenciales alteraciones en los mismos. El volumen total de sangre en los animales varía desde el 5% hasta el 10% del peso corporal.

Los eritrocitos son las células sanguíneas predominantes en la gran mayoría de las especies de peces. Una de las funciones más importantes de los eritrocitos es llevar oxígeno a los tejidos y dióxido de carbono a las branquias para su eliminación. Los leucocitos son los componentes fundamentales de la respuesta inmune de los peces, por lo que se utilizan como indicadores del estado de salud. Los trombocitos o plaquetas están involucrados en el proceso de coagulación sanguínea. A diferencia de los mamíferos, los eritrocitos y trombocitos de peces son células nucleadas.

La hematología es el estudio de la sangre y sus componentes, especialidad de la salud que está adquiriendo cada vez mayor importancia en la acuicultura debido a su alto valor como indicador fisiopatológico para el monitoreo del estado de salud de peces en cultivo. Los parámetros hematológicos se evalúan mediante un examen de laboratorio denominado hemograma, el cual incluye el recuento y morfología de las células sanguíneas y la concentración de hemoglobina.

En salmónidos, los trastornos hematológicos más frecuentes se asocian con enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas y estrés. Las alteraciones en la cantidad de leucocitos y su recuento diferencial (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos), representan importantes indicadores clínicos ya que orientan las potenciales causas infecciosas, estrés agudo y/o crónico, entre otras.

Los neutrófilos de peces presentan actividad mieloperoxidasa en los gránulos citoplasmáticos, por lo que son más semejantes a los neutrófilos de mamíferos que a los heterófilos de aves y reptiles. Adicionalmente, los basófilos han sido identificados solo en 4 de 121 especies de peces cartilaginosos y teleósteos y 14 de 20 especies de peces de agua dulce. En salmónidos, los basófilos no han sido descritos, pero los incluimos igualmente en este trabajo para eventuales aplicaciones en otras especies de peces.

Por otro lado, la bioquímica sanguínea se fundamenta en la detección y cuantificación de elementos tales como enzimas, substratos, minerales, entre otros, en el plasma o suero. Los métodos utilizados en mamíferos han sido adaptados para el análisis de peces, sin embargo, la interpretación de los resultados puede ser diferente ya que son influenciados por factores intrínsecos (especie, etapa productiva, sexo, estado nutricional y reproductivo) y extrínsecos (condiciones ambientales, densidad poblacional, método de captura y muestreo, entre otros).

Esta variabilidad fundamenta la necesidad de estimar intervalos de referencia (IR) respecto de la normalidad de los indicadores en los peces bajo condiciones productivas, de acuerdo, al menos, a la especie y etapa productiva de los animales. Un IR corresponde a un rango dentro del cual se encuentran los valores de una variable biológica en la mayoría de los individuos (95%) de una población clínicamente sana.

El IR basado en la población es una de las herramientas de laboratorio más utilizadas en el proceso de toma de decisiones clínicas. Técnicamente, cada laboratorio debería generar sus propios IR de acuerdo con la técnica y las condiciones de trabajo específicas, sin embargo, los elevados costos son una limitante crítica para llevarlo a la práctica. Los perfiles bioquímicos en salmónidos han sido utilizados con mayor frecuencia en la caracterización de enfermedades infecciosas, definiendo y cuantificando perfiles de funcionalidad sistémica tales como, función hepática, renal, cardiaca, pancreática, entre otros.

No obstante, el espectro de aplicación de estos indicadores se ha ampliado hacia la evaluación del estado de salud de los peces en cultivo, con el objetivo de cuantificar predictivamente la respuesta de los animales y, de esta manera, evaluar la eficacia de dietas funcionales, vacunas y peces resistentes a enfermedades. De esta manera, la aplicación de estos indicadores con la visión de la medicina preventiva, aportan concretamente a soportar técnicamente la toma de decisiones estratégicas que optimizan la gestión sanitaria y productiva de la industria.

Un aporte interesante del presente trabajo también es la difusión de IR para algunos parámetros asociados al estatus ácido-base y gases sanguíneos en salmónidos. Estos indicadores deben ser medidos inmediatamente después de obtenida la muestra de sangre, lo cual determina la aplicación de dispositivos o gasómetros portátiles (Point-of-Care) capaces de hacer mediciones rápidas y en condiciones de campo.

Por otro lado, la endocrinología en salmónidos ha tenido un impacto significativo en la comprensión de la función y evolución de varios mensajeros neuroquímicos y sistemas. De esta manera, la medición de la concentración de distintas hormonas en sangre es una herramienta rápida para evaluar procesos fisiopatológicos claves como la esmoltificación, estrés y reproducción.

De esta manera, los exámenes de laboratorio clínico constituyen una herramienta fundamental en la medicina de animales acuáticos, ya que apoya tanto el diagnóstico como el pronóstico de los peces en cultivo y su tratamiento. El objetivo de este Manual es aportar al conocimiento, identificación e interpretación de las pruebas de laboratorio clínico más utilizadas en la salmonicultura y apoyar el diagnóstico clínico de nuestros colegas que ejercen diariamente su profesión en la medicina de animales acuáticos.

Por último, además del contenido teórico-práctico, el presente Manual describe los IR de indicadores de hematología, bioquímica clínica, gasometría sanguínea y hormonas para salmónidos cultivados, contribuyendo al desarrollo y transferencia de un importante bien público para la industria en general y los médicos veterinarios en particular.

CAPÍTULO 1

Obtención de muestras de sangre

Obtención de muestras de sangre

V.F.D. Jaramillo, R.S. Ildefonso & M.A. Rozas-Serri

La obtención de muestras de sangre en peces se puede realizar mediante un muestreo letal (eutanasia) o no letal (sedación leve), dependiendo del tamaño de los animales y del objetivo del estudio. El uso de drogas anestésicas por inmersión en el agua es el método más utilizado para inducir eutanasia y sedación leve en salmónidos, con el objetivo de minimizar el nivel de estrés en los peces durante el procedimiento de obtención de la muestra de sangre y prevenir eventuales alteraciones en los resultados de laboratorio.

Entre los anestésicos más empleados en peces se encuentran la benzocaína, metomidato, etomidato, fenoxietanol, quinaldina, isoeugenol, metanosulfonato de tricaína (MS-222) y eugenol. Sin embargo, el anestésico más utilizado en peces es la benzocaína al 20% a una dosis de 15 a 20 mL (30 a 40 mg/L) por cada 100 L de agua. Los peces se deben mantener en la solución anestésica durante un rango de 2 a 5 minutos dependiendo si se busca inducir sedación profunda o eutanasia.

Se recomienda inducir sedación en no más de dos peces simultáneamente y evitar la manipulación excesiva de los mismos para minimizar el estrés. Para obtener una muestra de sangre mediante un muestreo letal, se debe confirmar primero la completa ausencia de movimientos operculares en los peces

Toma de la muestra de sangre

Materiales:

- Guantes de nitrilo o látex.
- Jeringas y agujas de tamaño acorde al tamaño de los peces.
- Anestésicos.
- Tubos para disponer la sangre según el objetivo del estudio.
- Cajas de poliestireno expandido o cooler para el transporte de las muestras.
- Gelpack o hielo para mantener la cadena de frío durante el transporte de las muestras al laboratorio.
- Datalogger desechable para control de temperatura durante el transporte.
- Desinfectante químico.

Método:

- La extracción de sangre debe ser aséptica, suave y cuidadosa debido a que coagula rápidamente y es altamente susceptible de hemólisis.
- Los peces deben ser colectados desde sus respectivas unidades de cultivo por personal entrenado, evitando una manipulación excesiva y disponiéndolos en recipientes con agua fresca.
- Dependiendo del objetivo del muestreo, los peces deben ser seleccionados de manera aleatoria o dirigida.
- El procedimiento de obtención y análisis de muestras de sangre considera dos fases. La fase preanalítica que incluye todas las actividades desde la selección y colección de los peces en el centro de cultivo hasta el arribo de las muestras de sangre al laboratorio. La fase analítica considera la detección y cuantificación de los indicadores y parámetros sanguíneos de interés en el laboratorio.
- Antes de la obtención de las muestras se debe seleccionar el tipo de tubo con o sin anticoagulante según el objetivo del análisis (Tabla 1), la fecha de vencimiento de estos, el tamaño de los peces y el tamaño de las agujas y jeringas (Tabla 2).

Tabla 1.
Tubos de recolección de sangre más utilizados en la práctica clínica en acuamedicina.

Color tapa	Aditivo y mecanismo de acción	Muestra	Uso	Tubo
Rojo	Sin anticoagulante	Suero	Bioquímica, Endocrinología	
Verde	Heparina: inhibición de la trombina	Sangre total, Plasma	Bioquímica, Hematología	
Violeta	EDTA (ácido etilendiaminotetraacético):	Sangre total	Hematología	
Celeste	Captura de calcio Citrato de sodio:	Plasma	Coagulación	
Gris	Captura de calcio Fluoruro de sodio: Captura de calcio	Plasma	Lactato Glucosa	

Tabla 2.
Consideraciones previas a la obtención de la muestra de sangre según el tamaño de los peces y después de la selección de los análisis a realizar.

Estadio	Agujas	Tamaño tubos
Alevines < 20 g	Capilares 27.5 G x 1/2”	0.5 a 1 ml
Alevines > 20 g	23 G x 1” 25 G x 5/8”	1 ml
Smolt	21 G x 1 1/2” 23 G x 1”	1 a 2 ml
Adulto	21G x 11/2”	2 a 4 ml

Las muestras de sangre pueden ser extraídas mediante punción de vena caudal, punción intracardíaca, punción de aorta dorsal y corte del pedúnculo, dependiendo del objetivo del análisis y el tamaño de los animales.

Punción vena caudal:

- Posicionar el pez de cúbito lateral sobre superficie antideslizante.
- Inducir anestesia leve solo para reducir su movimiento y mantener la frecuencia cardíaca, de tal manera de obtener la cantidad suficiente de sangre.
- Introducir la aguja perpendicular (Figura 1) o lateralmente (Figura 2), aproximadamente de 1 a 2 cm posterior a las aletas pélvicas.
- Introducir la aguja hasta el punto de contacto con la columna vertebral.
- Retirar suavemente la aguja, desmontarla de la jeringa y desecharla en un recipiente para objetos cortopunzantes.
- Vaciar la muestra de sangre lentamente desde la jeringa usando la pared interna del tubo recolector.
- Si el tubo posee anticoagulante, completar el tubo hasta la marca indicada por el fabricante, ya que el volumen de sangre debe ser acorde con la cantidad de anticoagulante. Un exceso de sangre provoca coagulación y una pequeña cantidad genera crenación de los eritrocitos y dilución de la muestra.
- Si el tubo posee anticoagulante, agitar el tubo suavemente por inversión entre 10 a 15 veces hasta lograr la correcta homogenización.
- En el caso de realizar un muestreo no letal, devolver inmediatamente el pez a un recipiente con agua fresca y monitorear el proceso de recuperación.
- Disponer los tubos en caja de poliestireno expandido con gelpack o hielo y datalooger para transporte de las muestras hasta el laboratorio.

Figura 1. *Punción vena caudal mediante abordaje perpendicular en presmolts de salmón del Atlántico.*

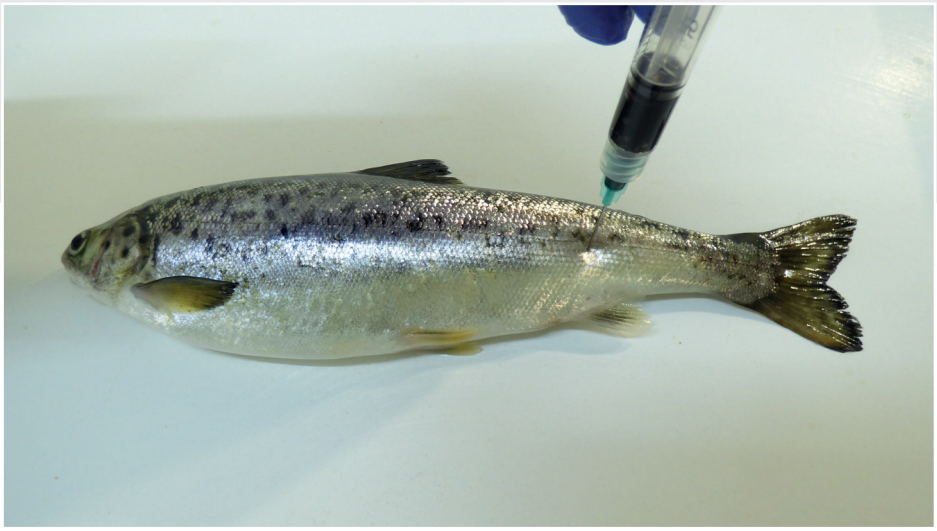


Figura 2. *Punción vena caudal mediante abordaje lateral en presmolts de salmón del Atlántico.*

Punción cardíaca:

- Posicionar el pez de cúbito lateral sobre superficie antideslizante.
- Inducir anestesia leve solo para reducir su movimiento.
- Puncionar el bulbo arterioso cardíaco o directamente el corazón, anatómicamente ubicado entre las branquias y el timo (Figura 3).
- Considerar las contracciones cardíacas al momento de la toma de muestra para evitar la salida de la aguja desde el corazón.
- Retirar suavemente la aguja, desmontarla de la jeringa y desecharla en un recipiente para objetos cortopunzantes.
- Vaciar la muestra de sangre lentamente desde la jeringa usando la pared interna del tubo.
- Si el tubo posee anticoagulante, completar el tubo hasta la marca indicada por el fabricante.
- Si el tubo posee anticoagulante, agitar el tubo suavemente por inversión entre 10 a 15 veces hasta lograr la correcta homogenización.
- Disponer los tubos en caja de poliestireno expandido con gelpack o hielo y datalooger para transporte de las muestras hasta el laboratorio.
- Si el procedimiento se realiza según protocolo, el muestreo no es letal y los individuos pueden ser devueltos inmediatamente al recipiente con agua fresca. Sin embargo, la manipulación puede ser letal si se induce un daño irreversible del tejido cardíaco.

Figura 3. *Punción cardíaca mediante abordaje ventral en presmolts de salmón del Atlántico.*

Punción aorta dorsal:

- Posicionar el pez de cúbito dorsal o supino sobre superficie antideslizante.
- Este método puede ser letal o no letal, pero el riesgo de mortalidad de los peces manipulados es más alto que los métodos descritos previamente.
- Inducir anestesia leve solo para reducir su movimiento o inducir eutanasia.
- Insertar la aguja en un ángulo de 45° con el bisel apuntando hacia arriba, a lo largo de la línea media dorsal del paladar, justo después de la unión del segundo arco branquial (Figura 4).
- Retirar suavemente la aguja, desmontarla de la jeringa y desecharla en un recipiente para objetos cortopunzantes.
- Vaciar la muestra de sangre lentamente desde la jeringa usando la pared interna del tubo.
- Si el tubo posee anticoagulante, completar el tubo hasta la marca indicada por el fabricante.
- Si el tubo posee anticoagulante, agitar el tubo suavemente por inversión entre 10 a 15 veces hasta lograr la correcta homogenización.
- Disponer los tubos en caja de poliestireno expandido con gelpack o hielo y datalooger para transporte de las muestras hasta el laboratorio.

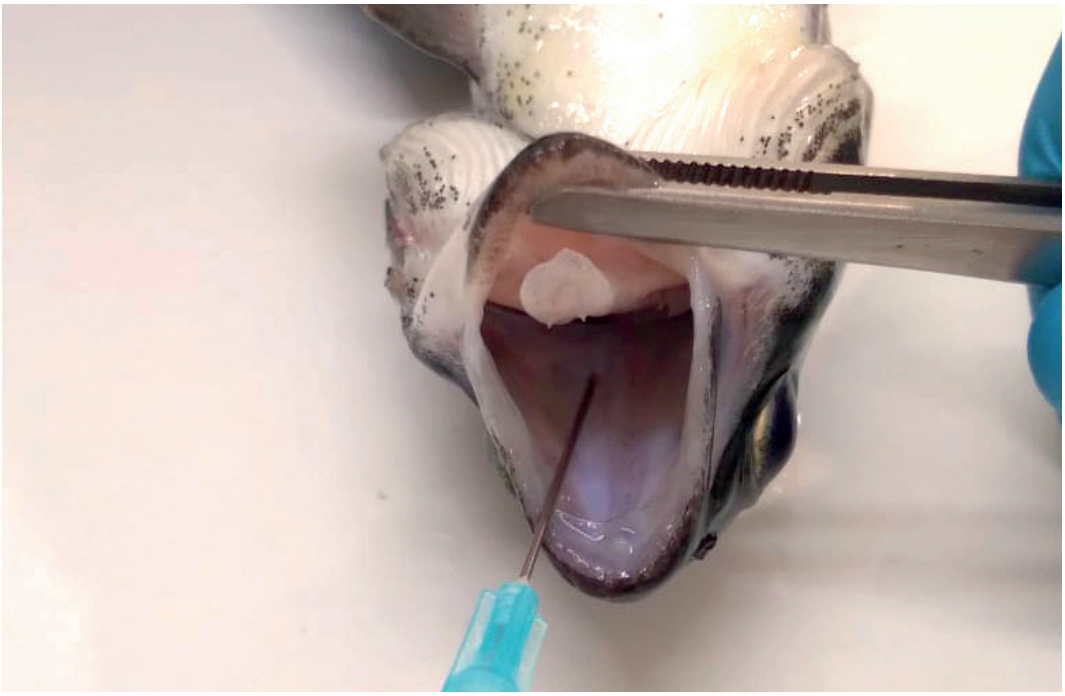


Figura 4. *Punción aorta dorsal abordaje bucal en presmolts de salmón del Atlántico.*

Corte de pedúnculo:

- Esta técnica se utiliza en peces de pequeño tamaño porque no es posible obtener una muestra de sangre mediante punción. Este procedimiento es siempre letal. La cantidad de sangre que se puede obtener es reducida y se presenta en forma de fuga o caída desde la cola.
- Posicionar el pez de cúbito lateral sobre superficie antideslizante.
- Cortar la zona del pedúnculo en forma de bisel y recolectar la sangre en capilares heparinizados por capilaridad.
- Sellar el capilar y refrigerar o disponer los tubos en caja de poliestireno expandido con gelpack o hielo y datalooger para transporte de las muestras hasta el laboratorio.

BOX 1.

Las principales consideraciones durante la fase preanalítica o de obtención, disposición y transporte de muestras de sangre son: (1) Homogenización de la muestra mediante agitación suave del tubo de 10 a 15 veces; (2) Temperatura de transporte mediante la disposición de los tubos con muestras en contenedores adecuados para mantener una cadena de frío entre 4 a 8°C y protección de luz solar directa; (3) Tiempo de transporte al laboratorio según el tipo de análisis a realizar: (i) Hematología de 12-24 h máximo; (ii) Sangre sin centrifugar de 12-24 h máximo; (iii) Plasma/suero refrigerado idealmente 24 h (v) Plasma/suero congelado puede ser > 24 h.

CAPÍTULO 2

Hematología en salmónidos

Hematología en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara, V.C. Arnés, A. Müller, R.S. Ildefonso & M.A. Rozas-Serri

Un hemograma completo es un análisis de sangre que se utiliza para evaluar el estado de salud general y detectar una amplia variedad de enfermedades en peces, incluida anemias e infecciones. Un aumento o una disminución anormal en los recuentos de células, podría indicar la presencia de una enfermedad (Tabla 1). En salmónidos, el hemograma se realiza rutinariamente de forma manual debido a que los eritrocitos y trombocitos son células con núcleo, tal como los leucocitos.

ERITOGRAMA

El eritrograma o la serie roja incluye el recuento de eritrocitos y su evaluación morfológica, el hematocrito o Volumen Globular Aglomerado (VGA), la concentración de hemoglobina (Hb) y los índices eritrocitarios de Wintrobe -Volumen Corpuscular Medio (VCM) y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) (Tabla 1).

Recuento de eritrocitos

Los eritrocitos de peces son ovales a elipsoidales con un núcleo basófilo ovalado a elipsoidal centralmente posicionado y un citoplasma eosinofílico pálido. Anisocitosis y policromasia leve son hallazgos normales en la sangre de peces, es decir, eritrocitos con núcleos más redondos, cromatina menos condensada y citoplasma más basófilo.

Tabla 1.
Parámetros hematológicos de un hemograma completo.

Eritrograma	Unidad medida	Función
Recuento Eritrocitos (RGR)	x 10^6 µL	Transporte de oxígeno
Eritrocitos inmaduros o Reticulocitos	x 10^6 µL	Eritrocitos inmaduros altamente demandados en circulación en cuadros de anemia
Hemoglobina (Hb)	g/L	Proteína de los eritrocitos que transporta el oxígeno
Volumen Corpuscular Medio (VCM)	fL	Media del volumen individual de los eritrocitos (tamaño)
Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)	g/L	Cantidad de Hb que contienen los eritrocitos en un volumen determinado
Hematocrito (VGA)	%	Proporción de eritrocito comparada con el plasma de la sangre

Tabla 1.
Parámetros hematológicos de un hemograma completo.

Leucograma	Unidad medida		Función
Recuento Leucocitos (RGB)	cel/µL		Células ejecutoras de la respuesta inmunitaria
Recuento diferencial	**Absoluto**	**Relativo**	
Basófilos	cel/µL	%	Células inflamatorias predominantes en reacción alérgica
Eosinófilos	cel/µL	%	Células inflamatorias predominantes en respuesta antiparasitaria y reacción alérgica
Neutrófilos	cel/µL	%	Célula homóloga a neutrófilos en mamíferos y su función es predominantemente fagocitaria
Basiliforme Neutrófilo	cel/µL	%	Forma juvenil del neotrófilo y que aparece en periodos de alta demanda
Linfocitos	cel/µL	%	Ejecutores de la respuesta inmune humoral y mediada por células
Monocitos	cel/µL	%	Abandonan la circulación para convertirse en macrófagos en los tejidos, cuya función es predominantemente la fagocitosis y la presentación de antígenos a linfocitos
Trombocitos	cel/µL		Participan en la coagulación de la sangre
Proteínas Plasmáticas Totales (PPT)	g/L		Considera la albúmina que impide que se escape líquido fuera de los vasos sanguíneos y las globulinas que son parte importante del sistema inmune

La eritropoyesis es el proceso de formación de eritrocitos en el tejido hematopoyético y puede ser afectado por eventos de anemias, temperatura del agua, estacionalidad, etapa productiva, entre otros factores; influenciando directamente la cantidad de eritrocitos y reticulocitos circulantes. Entonces, el recuento de eritrocitos inmaduros podría ser útil como indicador de la eficacia de la respuesta regenerativa del tejido hematopoyético después de un periodo de alta demanda sistémica de oxígeno.

El recuento total de eritrocitos en peces se determina usando el método manual del hemocitómetro o recuento en cámara de Neubauer, el cual es un estudio cuantitativo de los elementos figurados de la sangre por unidad de volumen (N°células/µL). La principal tinción para el recuento específico de eritrocitos y leucocitos de sangre en peces es Natt-Herrick.

Materiales

- Preparar una dilución 1:200 añadiendo 20 µL de sangre en 3.980 mL de Natt-Herrick (Tabla 2).
- Cámara de recuento de Neubauer o hemocitómetro.

Método:

- Disponer la solución en la cámara de Neubauer.
- Dejar las células sedimentar durante 5 minutos.
- Contar las células usando un microscopio óptico con aumento 400X.
- Utilizar el cuadrado central de la cámara que está dividido en 25 cuadrados, de los que se cuentan 5 (4 de las esquinas y el central). Cada uno de estos está dividido en 16 cuadrículas (Figura 1).
- El número obtenido se multiplica por 10.000 para calcular el recuento total de eritrocitos por mL de sangre. Este factor se obtiene a partir de fórmula: **RE = E x 5 x 10 x D**, donde, **RE:** recuento total de eritrocitos por mm^3 sangre; **H:** número de eritrocitos contados en los 5 cuadrados; **D:** factor de dilación.

Tabla 2.
Preparación de la solución de Natt-Herrick.

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio [NaCl]	3.88 g
Sulfato de sodio [$NaSO_4$]	2.50 g
Fosfato de sodio [Na_2HPO_4]	1.74 g
Fosfato de potasio [KH_2PO_4]	0,25 g
Formalina [37%]	7.50 mL
Violeta de genciana	0.10 g

*Ajustar el pH a 7.3, agregar colorante y llevar a 1.000 mL con agua destilada. Filtrar a través de papel filtro # 10.

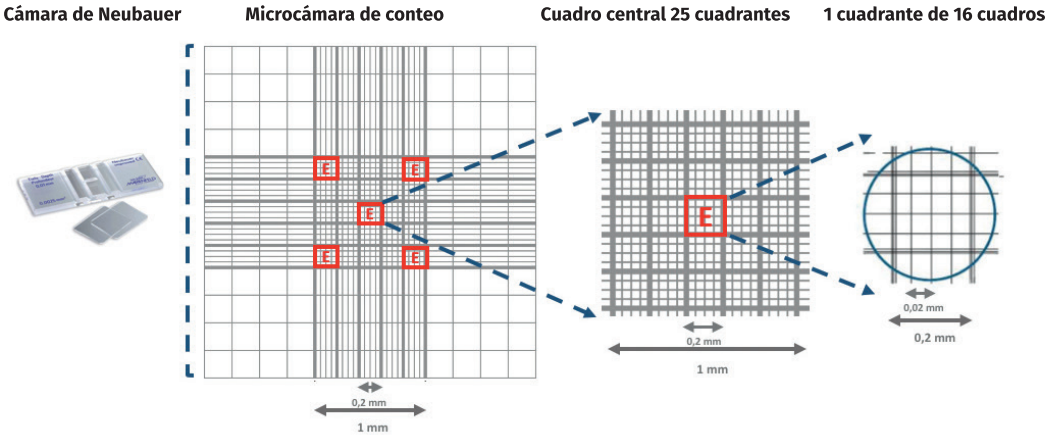


Figura 1. *Descripción general del método de conteo de eritrocitos en cámara de Neubauer (E: zonas donde se realiza el recuento de eritrocitos).*

Hematocrito o VGA

La técnica manual estándar para determinación de VGA en peces es el uso de tubos capilares de micro-hematocrito y centrifugación.

Materiales:

- Tubos micro-hematocrito de 75 x 1.5 mm, sellador de plastilina, centrífuga de micro-hematocrito y regla de lectura de hematocrito.

Método:

- Llenar el tubo de micro-hematocrito por capilaridad hasta un 70 a 90% de capacidad sosteniéndolo horizontalmente.
- Cerrar un extremo del tubo presionándolo en el sellador de plastilina una o dos veces.
- Limpiar el exceso de sangre en el exterior del capilar con papel absorbente.
- Cargar los tubos en la centrífuga de micro-hematocrito y programar a 12.000 G por 5 minutos (Figura 2).
- Confirmar la presencia de las tres capas en el tubo de arriba hacia abajo: plasma, capa flogística o capa leucocitaria y, finalmente, eritrocitos empaquetados en la parte inferior (Figura 2). La capa flogística está conformada por células nucleadas y trombocitos.
- Superponer el tubo de micro-hematocrito sobre la regla de lectura, alineado primeramente la interfaz eritrocito-arcilla del tubo en la línea 0 de la regla y la parte superior de la columna de plasma en la línea 100 de la misma.
- Leer la posición de la parte superior de la columna de eritrocitos sobre la regla y obtener el valor de VGA expresado en porcentaje (%) (Figura 2).

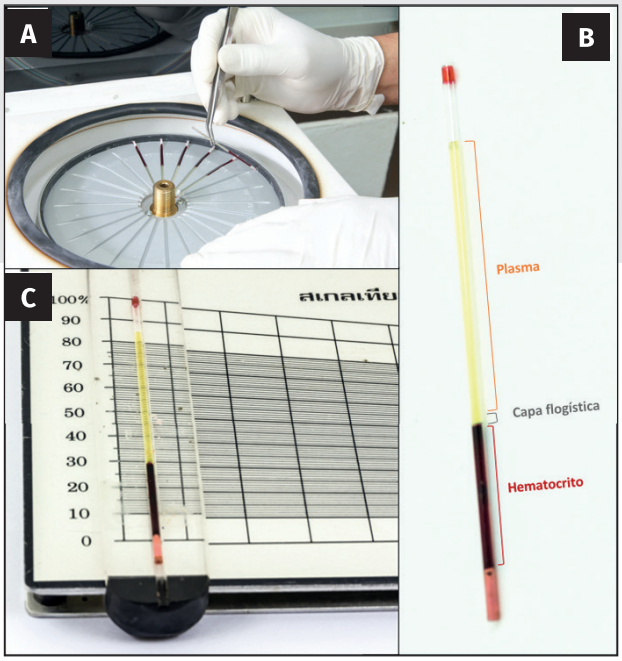


Figura 2. *Determinación del hematocrito. (A) Centrifugación de los capilares de micro-hematocrito. (B) Ordenamiento de las diferentes capas celulares y plasma en capilar de micro-hematocrito: Plasma, Capa flogística y Hematocrito. (C) Superposición del tubo de micro-hematocrito sobre la regla de lectura y estimación del hematocrito.*

Hemoglobina

La hemoglobina es una hemoproteína de la sangre que transporta el oxígeno desde las branquias hasta los tejidos, y el dióxido de carbono desde los tejidos hasta las branquias. Además, participa en la regulación de pH de la sangre. La concentración de hemoglobina en sangre puede ser cuantificada y expresada en gramos por litro (g/L) mediante el método de cianometahemoglobina.

Materiales:

- Preparar reactivo de Drabkin según las indicaciones de la Tabla 3, el cual induce una rápida lisis de los eritrocitos, liberando la hemoglobina en la fase líquida.
- Hemoglobinómetro.

Método:

- Diluir 20 µL de sangre con anticoagulante en 5 mL de reactivo Drabkin.
- Esperar 3-5 minutos para que ocurra la hemólisis y centrifugar a 1.500 a 2.000 G por 10 minutos para la sedimentación de los núcleos libres.
- Medir la concentración de Hg usando un hemoglobinómetro, el cual estima la absorbancia a 540 nm por espectrofotometría. La absorción de luz es proporcional a la concentración de hemoglobina.

Tabla 3. Preparación de reactivo Drabkin.

Substancia	Cantidad
Bicarbonato de sodio [NaHCO3]	1.00 g
Cianuro de potasio [KCN]	0.05 g
Ferrocianuro de potasio [Na4Fe(CN)6]	1.74 g
Agua destilada	1.000 mL

Índices eritrocitarios de Wintrobe

El VCM es proporcional al tamaño promedio de los eritrocitos expresado como femtolitro (fL) y se calcula a partir del VGA y recuento de eritrocitos: **VCM (fL) = VGA (%) x 10/Nº eritrocitos en millones /µL**. Ejemplo: Si VGA es 45% y Nº eritrocitos es 1.2 millones; entonces VCM = 45 x 10/1.2 = 375 fL.

La CHCM proporciona un índice de la cantidad de Hg relativa al VGA expresado en gramos por litro (g/L): **CHCM (g/L) = Hg (g/L) x 100/ VGA (%)**. Ejemplo: Si Hg es 100 g/L y VGA es 45%, entonces CHCM = 100 x 100/45 = 222 g/L.

Interpretación de resultados del eritrograma

Variaciones individuales en el VGA y/o Hg se asocian con cambios en la temperatura del agua, concentración de oxígeno disuelto, densidad de cultivo, fotoperiodo y/o madurez sexual. Peces con hematocrito > 60% se pueden considerar en estado de deshidratación, particularmente cuando se acompaña de un incremento del nivel plasmático de proteínas totales. Por otro lado, los peces que cursan con anemia usualmente muestran un hematocrito significativamente bajo (<20%).

En animales de producción, los resultados también son interpretados agrupadamente entre peces de diferentes unidades de cultivo (estanques o jaulas), entre peces con diferentes tratamientos o manejos, entre peces en diferente estado fisiológico, entre otras. Por ejemplo, los individuos de salmón del Atlántico, *Salmo salar,* tienen un hematocrito más alto durante la etapa pre-desove en comparación con la etapa de desove.

La manipulación de los animales para la obtención de muestras de sangre puede inducir alteraciones en los resultados del eritrograma, p.e. aumentando el hematocrito hasta en un 25%. La manipulación de salmónidos durante más de 20 segundos determina la liberación de catecolaminas que causan hemoconcentración y aumento del tamaño de los eritrocitos.

BOX 1.

Los resultados del eritrograma se interpretan individualmente respecto de las desviaciones de los IR para la especie y la etapa productiva determinada, ya que los parámetros hematológicos en peces varían según la condición fisiológica, productiva, sanitaria y/o ambiental a la cual están sometidos. De esta manera, la interpretación de los resultados debe considerar los IR que permitan discriminar entre variaciones fisiológicas y patológicas.

La anemia es una disminución de la masa eritrocitaria y de la concentración de Hg en los eritrocitos por debajo del límite mínimo del IR. El resultado final es la reducción en el transporte de oxígeno a los tejidos. Las anemias pueden clasificarse según criterios etiológicos o morfológicos, pero la aproximación diagnóstica debe contemplar ambos criterios de manera complementaria (Figura 3).

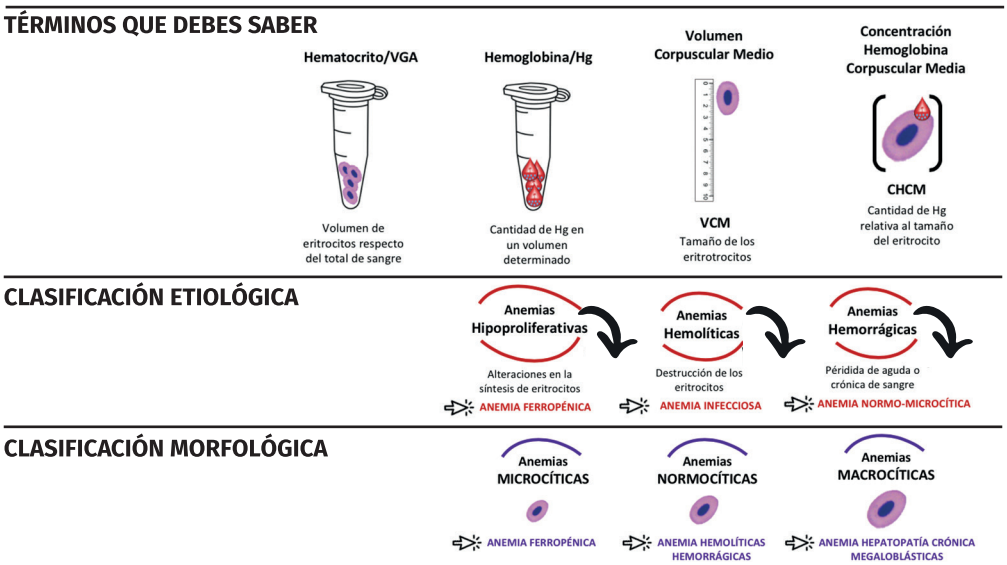


Figura 3. *Conceptos generales y clasificación de las anemias.*

Desde el punto de vista etiológico, las anemias se pueden catalogar en trastornos asociados a la incapacidad para producir eritrocitos de forma y cantidad adecuada (p.e. depresión del tejido hematopoyético) y trastornos resultantes de la destrucción incrementada (hemólisis) o pérdida de eritrocitos (hemorragia).

Por otro lado, la alteración del VCM y CHCM permiten clasificar la anemia desde el punto de vista morfológico según el tamaño del eritrocito y concentración de hemoglobina de este, respectivamente (Figura 3).

- **Anemia microcítica hipocrómica.** Se caracteriza por eritrocitos más pequeños (VCM bajo) y con baja concentración de Hg de lo normal (CHCM). En este grupo se encuentran la anemia por deficiencia de hierro y talasemia, y las anemias que acompañan a las infecciones crónicas.

- **Anemia macrocítica normocrómica.** Se caracteriza por eritrocitos más grandes de lo normal (VCM alto) y con una concentración de Hg normal (CHCM normal). Incluye a la anemia megaloblástica, ya sea secundaria a deficiencia de ácido fólico o vitamina B_{12}. Hepatopatías y algunos casos de anemia aplásica. En general, son anemias no regenerativas.

- **Anemia normocítica normocrómica.** Se caracteriza por eritrocitos de tamaño (VCM normal) y concentración de Hg normal (CHCM normal). Una causa característica es la anemia secundaria a hemorragia aguda o a la hemólisis intrínseca o extrínseca.

Las anemias también se clasifican según la respuesta reticulocitaria o policromasia en anemias regenerativas y no regenerativas. El recuento de reticulocitos refleja el estado de actividad del tejido eritropoyético. En las anemias regenerativas se observa una respuesta reticulocitaria elevada, lo cual indica incremento de la regeneración eritropoyética, como sucede en las anemias hemolíticas y hemorrágicas. Las anemias no regenerativas son aquellas que cursan con respuesta reticulocitaria baja o policromasia baja o nula, por lo que se asocian con un tejido de baja actividad. En general, la gran mayoría de las anemias crónicas son anemias no regenerativas.

Anemia por déficit nutricional

El hierro y las vitaminas C, E, K, B_{12}, B_8, B_5 son elementos necesarios para la eritropoyesis, por lo que el déficit se asocia con anemia microcítica hipocrómica. Diversos estudios indican que el déficit de ácido fólico o vitamina C, no evidencia un efecto en el eritrograma, pero concuerdan en que los déficits nutricionales asociados a infecciones o intoxicaciones crónicas generan una anemia no regenerativa. De esta manera, cambios morfológicos del núcleo de los eritrocitos y la liberación de eritrocitos sin núcleo a la sangre periférica, pueden estar relacionadas con la deficiencia de ácido fólico o vitamina E.

Anemia por agentes tóxicos

La intoxicación con nitritos induce una anemia hemolítica caracterizada por una disminución del VGA y la Hg, ésta se oxida y se transforma en metahemoglobina. La intoxicación aguda genera una anemia hemolítica moderada a intensa caracterizada por disminución del VGA, Hg, eritrocitos y VCM, y aumento de CHCM. La hemólisis y los cambios en VCM y CHCM podrían no observarse en intoxicaciones crónicas.

Intoxicaciones con metales pesados reducen la vida media de eritrocitos por aumento de la hemólisis, además de influir en la eritropoyesis. De esta manera, el cobre y el zinc inducen anemia hemolítica no regenerativas, caracterizadas por una disminución de VGA, Hg, recuento de eritrocitos y CHCM, mientras que el VCM puede aumentar o permanecer normal.

Anemia inducida por enfermedades infecciosas

Salmónidos infectados por IHNv muestran anemia hemolítica y peces infectados por ISAv presentan una anemia hemorrágica, mientras que peces infectados con IPNv muestran una anemia no regenerativa por daño hepático. Peces con Vibriosis muestran anemia hemolítica asociada con toxinas que inducen apoptosis de eritrocitos e incremento de eritrocitos inmaduros en circulación.

Peces infectados crónicamente con *Piscirickettsia salmonis* presentan anemia hemorrágica microcítica hipocrómica regenerativa y un VGA entre 10 y 34%. Además, la infección aguda por *P. salmonis* podría inducir anemia hemolítica intravascular. Parásitos externos como el piojo de mar inducen anemia hemorrágica y protozoos microsporideos como *Nucleospora salmonis* y *Mycrosporidium spp.,* inducen anemia hemorrágica y hemolítica.

LEUCOGRAMA

Los análisis incorporados en la leucograma incluyen recuento total y diferencial de leucocitos identificados mediante frotis sanguíneo. Los leucocitos en peces salmónidos incluyen: eosinófilos, neutrófilos, neutrófilos baciliformes, linfocitos y monocitos.

Recuento total de leucocitos

Debido a que los peces tienen eritrocitos y trombocitos nucleados, no es posible realizar un leucograma en equipos automatizados como en mamíferos, por lo tanto el principal método de recuento de leucocitos en peces es manual mediante el uso de hemocitómetro o cámara de Neubauer y tinción de Natt-Herrick.

El recuento total de leucocitos (RL) se obtiene contando todos los leucocitos en los nueve cuadrantes grandes de la cámara de Neubauer y, la suma, se multiplica por 222, factor que se obtiene a partir de la siguiente fórmula: RL (µL) = número de leucocitos totales × 222. **RL = L/9 x 10 x D**, en donde; **RL:** recuento total de leucocitos por mm^3 sangre; **L:** número total de leucocitos en los 9 cuadrantes; **D:** factor de dilación.

La ventaja de este método es que también se puede realizar el recuento total de eritrocitos y trombocitos en el mismo procedimiento. Una desventaja es que la diferenciación de los trombocitos de los linfocitos pequeños a menudo es difícil, por lo que se recomienda hacer un único recuento en cámara para leucocitos más trombocitos. Luego, en el recuento diferencial de leucocitos en frotis se hace la corrección de trombocitos por leucocitos.

Recuento diferencial de leucocitos

El recuento diferencial de leucocitos puede ser relativo o absoluto. El recuento relativo se refiere al porcentaje (%) de un determinado tipo de leucocito respecto del total de células blancas. El recuento absoluto se calcula multiplicando el porcentaje relativo obtenido por el número de leucocitos que se cuentan en un mm^3 de sangre divido por 100 (número de leucocitos/µL).

Para realizar un recuento diferencial de leucocitos se debe realizar un frotis de sangre en un portaobjetos mediante extendido y tinción Giemsa (Figura 4):

- Tomar un portaobjeto limpio entre los dedos pulgar y medio.
- Limpiar con el pincel.
- Colocar en uno de los extremos una gota pequeña de sangre previamente mezclada con el anticoagulante o directa desde la toma de muestra.
- Realizar la extensión con otro portaobjeto de canto perfectamente liso, de manera de correrlo

por delante de la gota hasta tomar contacto con ella y deslizarlo suavemente hacia adelante procurando obtener una monocapa. El ángulo del portaobjeto determina el grosor de la película, por lo que se sugiere usar 30º.

- Secar al calor del mechero, al aire o con un secador de pelo para minimizar la presentación de artefactos celulares.
- Cubrir los frotis secos con alcohol metílico absoluto por 3 a 5 min. Verter el excedente y luego secar al aire.
- Preparar colorante Giemsa diluido y fresco: 1 mL de buffer fosfato pH 6.9 por 2 gotas de solución Giemsa.
- Para estudio de rutina dejar el portaobjeto en el colorante por 15 min.
- Eliminar el excedente, lavar en agua corriente suave y dejar secar a temperatura.
- Al microscopio, contar 100 leucocitos bajo objetivo de inmersión (1000X) y obtener un porcentaje de cada uno de los tipos celulares: eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y monocitos. Adicionalmente, el frotis de sangre se utiliza para evaluar la morfología de leucocitos, eritrocitos y trombocitos, pero también para búsqueda de parásitos o bacterias.

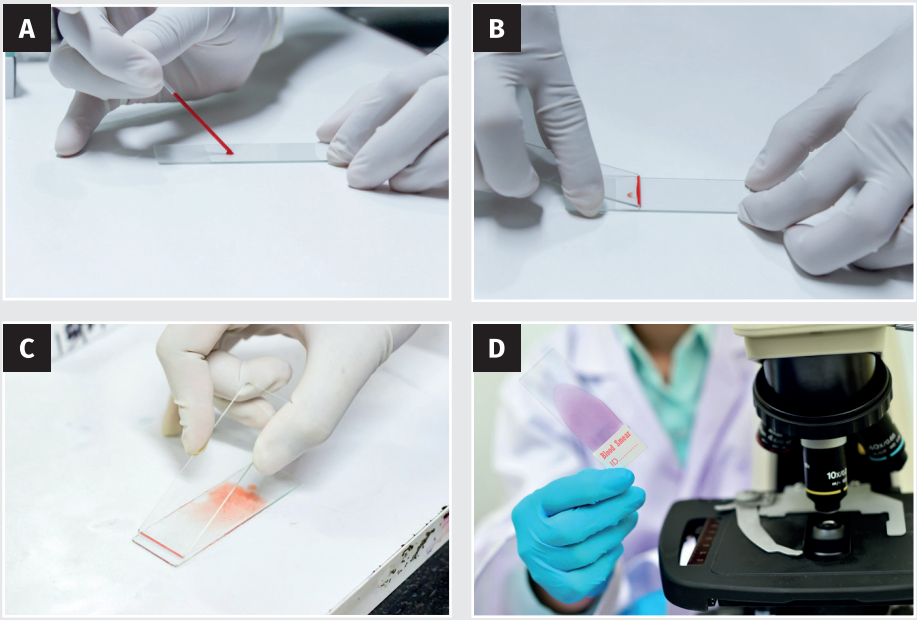


Figura 4. *Frotis de sangre. (A) Colocar en uno de los extremos una gota pequeña de sangre previamente mezclada con el anticoagulante. (B) Presentar otro portaobjeto de canto perfectamente liso, de manera de correrlo por delante de la gota hasta tomar contacto con la misma. (C) Realizar la extensión suavemente hacia adelante procurando obtener una monocapa. (D) Realizar tinción Giemsa de los frotis, observar y contar 100 leucocitos bajo microscopio (1000X) y obtener el recuento diferencial (%).*

Factores fisiológicos como el estado reproductivo, crecimiento, esmoltificación y agentes estresores ambientales como la densidad de cultivo, calidad del agua y manejos productivos, pueden generar un aumento discreto del recuento de leucocitos, hallazgo denominado leucocitosis (Figura 5). Peces juveniles tienen recuentos leucocitarios y linfocitos más altos comparados con peces adultos. El efecto contrario ocurre en peces sometidos a estrés, ya que se observa una disminución del recuento de leucocitos o leucopenia con linfopenia y aumento relativo de granulocitos.

Los leucocitos se dividen en granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y agranulocitos (linfocitos y monocitos), los cuales se distinguen por sus características morfológicas y funcionales (Figura 5).

Granulocitos

Neutrófilos: Los neutrófilos de peces tienen propiedades muy similares a los neutrófilos de mamíferos y, a diferencia de los heterófilos, pueden ser distinguidos por la presencia de mieloperoxidasa en los gránulos citoplasmáticos. Miden entre 6.5 a 8.2 µm de diámetro, tienen un núcleo multilobulado, excéntrico y de color purpura (Figura 5). El citoplasma contiene gránulos y pueden presentar vacuolas. Los neutrófilos corresponden alrededor de un 20% de la población de leucocitos circulantes y presentan una alta capacidad para fagocitosis, quimiotaxis y funciones bactericidas (Figura 6).

Un incremento en el recuento de neutrófilos, neutrofilia, se observa usualmente en las enfermedades infecciosas (Figura 7). La presencia de neutrófilos activos se observa en enfermedades sistémicas graves en respuesta a la inflamación, p.e. en septicemias, infecciones micóticas y necrosis tisular severa.

Eosinófilos: Miden de 11 a 19 µm diámetro, presentan un núcleo bilobulado, excéntrico de color violeta que ocupa aproximadamente el 30% de la célula. El citoplasma presenta numerosos gránulos de color naranjo a rojo (Figura 5). Se presentan en una proporción menor al 5% en la circulación (Figura 6).

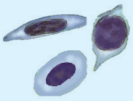
	TIPO DE CÉLULA	ILUSTRACIÓN	DESCRIPCIÓN (GIEMSA)	FUNCIÓN
	LEUCOCITOS			
Granulocitos	**Neutrófilos**		Núcleos multilobulado; gránulos citoplasmáticos; 6.5 a 8.5 µm um diametro	Capacidad fagocítica y quimiotáctica y funciones bactericidas
Granulocitos	**Eosinófilos**		Núcleo bilobulado; gránulos citoplasmáticos eosinofílicos; 11.4 a 12.6 µm	Respuesta contra parásitos y alergías
Granulocitos	**Basófilos**		Núcleo bilobulado; gránulos citoplasmáticos grandes y azul-púrpura; 11.4 a 12.6 µm	Liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios
Agranulocitos	**Linfocitos**		Núcleo esférico o mellado; citoplasma azul pálido; 4.5 a 8.0 µm	Respuesta inmune citotóxica (células T) o anticuerpos (células B)
Agranulocitos	**Monocitos**		Núcleo en forma de U o riñón; citoplasma azul-grisáseo; 12 a 15 µm	Fagocitosis porque se diferencian a macrófagos en los tejidos
	TROMBOCITOS		Forma variable redondos, alargados o en forma de huso; citoplasma incoloro a azul débil; núcleo condensado y puede contener gránulos eosinofílicos; 7.8 a 8.6 µm	Involucrados en la coagulación de la sangre, fagocitosis y otras funciones inmunológicas

Figura 5. *Descripción general y función de leucocitos y trombocitos en salmónidos.*

Los eosinófilos en peces usualmente son encontrados en bajas concentraciones, algunos estudios indican que estas células participan en la respuesta inflamatoria junto a los neutrófilos y macrófagos. El aumento en el recuento de eosinófilos, eosinofilia, en peces sugiere una respuesta inflamatoria asociada con infecciones parasitarias o estimulación antigénica (Figura 7).

Basófilos: Estas células han sido identificados solo en 4 de 121 especies de peces cartilaginosos y teleósteos y 14 de 20 especies de peces de agua dulce. En salmónidos, los basófilos no han sido descritos, pero los incluimos en esta sección para eventuales aplicaciones en otras especies de peces. Presentan un núcleo bilobulado y gránulos citoplasmáticos grandes y azul-púrpura. Miden entre 11.4 a 12.6 µm diámetro y, al igual que los eosinófilos, los basófilos participan de manera importante en la defensa antiparasitaria y en la inflamación que se amplifica cuando vierten el contenido de sus gránulos citoplasmáticos al medio extracelular (Figura 5).

Agranulocitos

Linfocitos: Miden de 6.5 a 8.0 µm de diámetro, son esféricos y poseen un núcleo excéntrico de color violeta que ocupa alrededor del 70% de la célula. Posee un escaso citoplasma levemente basofílico y sin gránulos (Figura 5). Son el leucocito predominante en la sangre circulante de peces correspondiendo a un 70 a 80% (Figura 6). Funcionalmente, se dividen en linfocito B y T, siendo responsables de la respuesta inmune adaptativa humoral y mediada por células, respectivamente.

La linfocitosis o aumento en el recuento de linfocitos circulantes se observa en procesos de estimulación inmunogénica, mientras que la linfopenia se observa en afecciones inmunosupresoras como estrés (Figura 7). Los mayores recuentos de linfocitos y de leucocitos totales se encuentran en peces cultivados en altas densidades, mala calidad de agua y/o con alta carga bacteriana. Leucocitosis acompañada de neutrofilia y linfocitosis ha sido observada en etapa inicial de la infección experimental por *P. salmonis.*

Monocitos: Su núcleo ocupa alrededor del 50% de la célula, es irregular, con forma de riñón, cromatina laxa y color violeta. El citoplasma es de color azul-grisáceo y puede contener vacuolas (Figura 5). Los monocitos son células grandes que corresponden entre el 1 y 5% de los leucocitos en salmónidos (Figura 6).

Los monocitos son células activamente fagocíticas que se especializan en macrófagos en los tejidos. La monocitosis o aumento en el recuento de monocitos circulantes ocurre en condiciones similares a las neutrofilias, pudiendo estar presentes tanto en la respuesta inflamatoria agudas como crónicas y asociadas a un agente infeccioso, cuerpo extraño y/o reacciones posteriores a la vacunación (Figura 7). En enfermedades infecciosas los monocitos se activan y se observan vacuolas citoplasmáticas prominentes, basofilia, núcleo pleomórfico y gránulos citoplasmáticos.

RECUENTO DE TROMBOCITOS

Los trombocitos de los peces son más pequeños que los eritrocitos, pueden ser redondos, alargados o en forma de huso dependiendo de la etapa de madurez o el grado de reactividad (Figura 5). De esta manera, los trombocitos inmaduros son redondos y los trombocitos maduros tienden a ser ovalados, mientras que los trombocitos en forma de huso y agrupados parecen ser formas reactivas (Figura 6). El núcleo de los trombocitos es condensado y pueden contener una cantidad variable de gránulos citoplasmáticos eosinofílicos.

Los trombocitos son los responsables de la coagulación sanguínea y el control de la pérdida de líquido en una lesión superficial. La formación del coágulo ocurre con fibrinopéptidos que se forman después de la escisión del fibrinógeno que está controlado por la trombina. Sin embargo, estos fibrinopéptidos difieren químicamente en los peces respecto de los mamíferos.

La agregación de trombocitos convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas con muy poca o nula formación de tromboxano, a diferencia de mamíferos, donde éste es un potente inductor de la agregación plaquetaria. La formación del coágulo en teleósteos usualmente ocurre alrededor de 5 min después de ocurrida la injuria y depende principalmente de la vía extrínseca de la coagulación.

El exceso de glucocorticoides tiende a disminuir la concentración de trombocitos y aumentar el tiempo de coagulación, por tanto, es un factor importante que considerar en el manejo de toma de muestras (Figura 7). Los factores estresantes como un fotoperiodo prolongado y una temperatura elevada del agua inducen trombocitopenia. En salmónidos, también se producen tiempos de coagulación prolongados por deficiencia de la vitamina K.

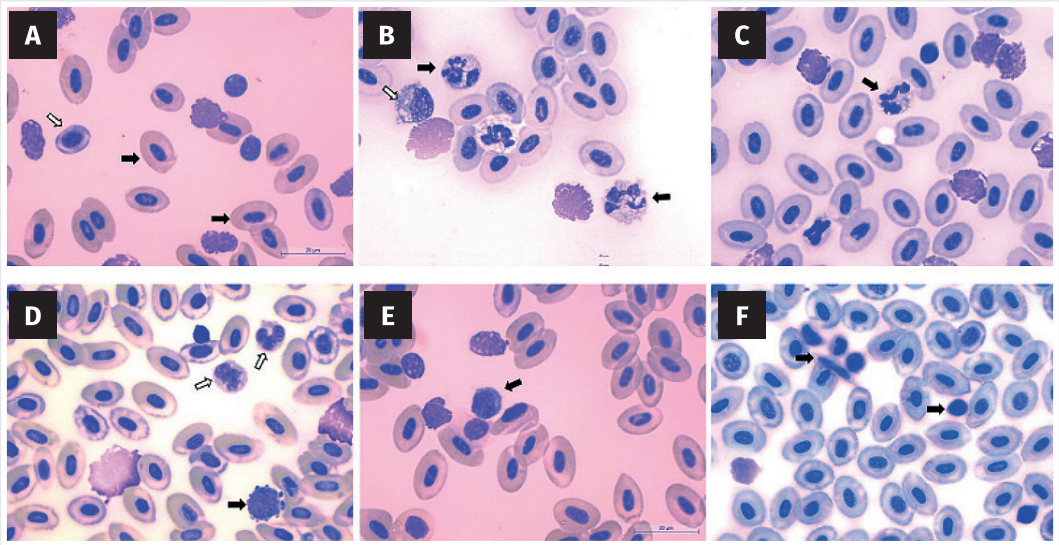


Figura 6. *Principales células sanguíneas en salmónidos. (A) Eritrocitos nucleados (flechas negras) y eritrocitos inmaduros o reticulocitos (flecha blanca) (Barra 20 µm); (B) Neutrófilos (flechas negras) y monocito (flecha blanca) (Barra 20 µm); (C) Neutrófilos (flecha negra) (Barra 20 µm); (D) Neutrófilos (flechas blancas) y linfocito reactivo (flecha negra) (Barra 20µm); (E) Linfocito (Barra 20 µm); (F) Trombocitos en forma en huso y redondos (flechas negras) (Barra 20 µm).*

PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES

Las proteínas plasmáticas se miden usando la columna de plasma en el tubo de micro-hematocrito. El tubo se rompe por encima de la capa flogística y la parte que contiene el plasma se utiliza para cargar el refractómetro. El instrumento se mantiene de modo que una fuente de luz ambiente pueda pasar a través del prisma humedecido con plasma y la refracción de la luz se lee en una escala a través de un ocular. El resultado de proteínas plasmáticas totales obtenido deberá ser multiplicado por 10 con el objetivo de expresar el resultado en g/L.

BOX 2.

La fagocitosis juega un papel fundamental en la inmunidad no específica en los peces, actividad desempeñada principalmente por fagocitos profesionales como neutrófilos, macrófagos y, en menor medida, los linfocitos B. La inmunología de peces ha avanzado rápidamente en los últimos años, sin embargo, persiste la escasez de anticuerpos monoclonales validados para caracterizar subpoblaciones de leucocitos. De esta manera, existe un conocimiento aún limitado respecto de marcadores específicos de células inmunes y sus procesos de activación y diferenciación. En este sentido, el leucograma continúa siendo una herramienta válida y económica para evaluar las células leucocitarias.

	TIPO DE CÉLULA	ILUSTRACIÓN	INTERVALO REFERENCIA *(Salmo Salar)*	AUMENTO	DISMINUCIÓN
	LEUCOCITOS		4.904 a 11.394 / µL	**Leucocitosis** Infecciones bacterianas y virales, Estrés agudo	**Leucopenia** Infecciones septicémicas severas, Estrés crónico
Granulocitos	**Neutrófilos**			**Neutrofilia** Infecciones bacterianas y virales, Inflamación y daño tisular, procesos metabólicos	**Neutropenia** Infecciones parasitarias, deficiencias de vitaminas, alteraciones de tejido hematopoyético
	Eosinófilos		3 a 17%	**Eosinofilia** Respuesta alérgica, infecciones parasitarias, vasculitis, nefropatías	**Eosinopenia** Infecciones bacterianas y virales, anemia aplásica, estrés
	Basófilos			**Basofilia** Infecciones, inflamación alérgica	**Basopenia** Estrés, alergia severa, inmunodepresión
Agranulocitos	**Linfocitos**		75 a 89%	**Linfocitosis** Infecciones bacterianas y virales, Inflamación crónica, vasculitis, estrés agudo	**Linfopenia** Infecciones virales crónicas, alteraciones de tejido hematopoyético, estrés crónico
	Monocitos		0.1 a 3%	**Monocitosis** Infecciones e inflamación crónica, respuesta autoinmune	**Monocitopenia** Deficiencia de vitamina B, alteraciones de tejido hematopoyético

Figura 7. *Interpretación del aumento o disminución de la población de leucocitos circulantes en salmónidos.*

CAPÍTULO 3

Bioquímica clínica en salmónidos

Bioquímica clínica en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara, V.C. Arnés, A. Müller & M.A. Rozas-Serri

La bioquímica clínica consiste en la cuantificación de la concentración de diversas sustancias químicas transportadas por la sangre en un momento determinado, los cuales informan al médico veterinario respecto del diagnóstico, la evolución de la enfermedad y la utilidad de un tratamiento. Los parámetros orientan sobre la funcionalidad de diferentes órganos y sistemas de los peces, p.e. hígado, riñón, corazón, etc (Tabla 1).

Durante la fase preanalítica de obtención de la muestra de sangre, se debe considerar que la manipulación de los peces durante más de 20 segundos puede inducir cambios en los parámetros bioquímicos. Los cambios *in vitro*, posterior a la recolección de sangre, se pueden minimizar separando rápidamente el plasma de los eritrocitos después de obtener la sangre.

Existen distintos métodos para estudiar la bioquímica clínica en peces, ya sea basada en química seca o química húmeda, por lo que requieren equipamiento y personal entrenado. Adicionalmente, se encuentran disponibles equipos portátiles para uso en terreno, que requieren bajos volúmenes de muestra y un entrenamiento mínimo. En el caso de la química húmeda, se debe asegurar que la técnica tiene la sensibilidad y el límite lineal de detección deseado, así como conocer los interferentes que podrían alterar los resultados (hemólisis, ictericia).

Tabla 1. Principales parámetros de bioquímica sanguínea de salmónidos.

Grupo	Analito	Abreviación	Unidad medida
Electrolitos	Sodio	Na	mmol/L
	Cloro	Cl	mmol/L
	Potasio	K	mmol/L
Minerales	Fósforo	P	mmol/L
	Fierro	Fe	mmol/L
	Magnesio	Mg	mmol/L
	Calcio	Ca	mmol/L
Enzimas	Fosfatasa alcalina	ALP	U/L
	Amilasa total	AMT	U/L
	Amilasa pancreática	AMP	U/L
	Lipasa	LIP	U/L
	Lactato deshidrogenesa	LDH	U/L
	Creatina quinasa	CK	U/L
	Aspartato aminotransferasa	AST	U/L
	Alalino aminotransferas	ALT	U/L
Substratos	Colesterol	COL	mmol/L
	Lipoproteína de alta densidad	HDL	mmol/L
	Lipoproteína de baja densidad	LDL	mmol/L
	Triglicéridos	TRG	mmol/L
	Proteína total	PTO	g/L
	Albúmina	ALB	g/L
	Globulinas	GLO	g/L
	Glucosa	GLU	mmol/L
	Lactato	LAC	mmol/L
	Creatinina	CRE	µmol/L
	Úrea	URE	mmol/L
	Ácido úrico	AUR	µmol/L
	Amonio	NH4	µmol/L

Existen varias técnicas para medir los parámetros de bioquímica clínica, pero la espectrofotometría de absorbancia es una de las técnicas más utilizadas y la que describiremos en el presente trabajo. La espectrofotometría de absorbancia es una técnica analítica semi-automatizada o automatizada en la que la concentración de las sustancias se determina dirigiendo un haz de luz a través de una solución que contiene la sustancia de interés y luego se mide la cantidad de luz que absorben.

La espectrofotometría de absorbancia puede ser realizada mediante el ensayo de punto final o el ensayo cinético. Los ensayos de punto final se aplican cuando se mide la concentración de una sustancia preexistente en suero o plasma. En dicho ensayo, se añade reactivo a una cantidad de suero o plasma y el producto resultante se mide por espectrofotometría. Luego, mediante el uso de una curva de calibración y/o una constante de calibración, se calcula la concentración de la sustancia. Un ejemplo de reacción de punto final es la utilizada para determinación de albumina sérica.

Los ensayos cinéticos se utilizan para medir indirectamente la actividad enzimática o la velocidad con la que una enzima convierte un sustrato en producto, lo cual requiere múltiples mediciones de la concentración del producto en el tiempo. Entonces, mientras más rápido se obtiene el producto, mayor es la actividad de la enzima. Un ejemplo de reacción cinética es la utilizada para la determinación de la actividad de enzimas transaminasas (ALT, AST).

Interpretación de resultados de bioquímica sanguínea

Funcionalidad hepática y metabólica

El tejido hepático de los peces teleósteos tiene alta actividad de transaminasas como AST y ALT. Por lo tanto, la actividad plasmática de estas enzimas puede elevarse con una enfermedad hepatocelular grave. La concentración de ALP se registra usualmente incrementada en casos de daño y obstrucción de conductos biliares o colestasis. Sin embargo, el nivel de estas enzimas no es tan elevado en enfermedades crónicas. Adicionalmente, la funcionalidad hepática se debe evaluar con la medición de metabolitos producidos en hígado y que tienen implicancia en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Las proteínas totales en plasma están representadas principalmente por albúminas y globulinas. La hipoproteinemia o disminución de albúminas y globulinas en peces es indicativa de desnutrición, baja síntesis hepática y por pérdida o degradación en infecciones. El primer signo de hipoproteinemia es reducción del crecimiento, lo cual redunda en una alteración de la función hepática y hematopoyética y disminución de la concentración de calcio debido a que este se transporte asociado a la albúmina. El aumento de las concentraciones de proteínas totales puede darse por estado de deshidratación, con aumento principalmente de las albúminas o por el aumento de las globulinas, en casos de estimulación antigénica con producción de anticuerpos, como es en algunos procesos inflamatorios/infecciosos incluida la vacunación.

Los pigmentos biliares en la mayoría de los peces incluyen bilirrubina y biliverdina; sin embargo, los porcentajes de estos pigmentos varían entre las especies. El suero/plasma usualmente es de un color amarillo claro debido a la presencia de bilirrubina, sin embargo, una hepatopatía en peces puede no generar un aumento en las concentraciones de bilirrubina plasmática, ya que estas también se verán afectadas por condiciones pre-hepáticas, como hemólisis.

La concentración plasmática de glucosa en peces es variable. La fuente de glucosa plasmática proviene del metabolismo hepático de glucógeno; por lo tanto, el agotamiento de las reservas hepáticas de glucógeno puede redundar en hipoglucemia. La concentración plasmática de glucosa también varía con la edad, el estado nutricional, reproductivo y el estrés. La duración y la magnitud de la hiperglucemia postprandial en peces dependen de la ingesta de carbohidratos en la dieta, el efecto de la inanición sobre la concentración de glucosa plasmática depende de la especie y del tiempo, ya que muchas especies de peces presentan concentraciones normales de glucosa en sangre (hasta 150 días).

La variación en la concentración de glucosa también varía con el estado reproductivo y el sexo de los animales, pudiendo ser más bajos en machos que en hembras durante el período de desove. La hiperglucemia inducida por el cortisol en eventos de estrés es frecuente en salmónidos y la duración depende de la intensidad del estrés. La hiperglucemia plasmática asociada con glicogenólisis en el hígado y el músculo es probablemente debido al aumento de las catecolaminas.

No es claro si los cambios en la concentración plasmática de colesterol tienen significancia con respecto a su concentración en hepatopatías. La mayoría de los peces tienen concentraciones más altas de colesterol en la sangre que los mamíferos y aproximadamente el 60% del colesterol es transportado por lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los machos sometidos a espermatogénesis activa tienen valores más altos de colesterol en comparación con los machos inactivos. Las hembras tienen concentraciones

más bajas de colesterol en la sangre en comparación con los machos.

Los triglicéridos son lípidos sintetizados en el hígado y constituyen una de las principales formas de almacenamiento de energía de los peces. Los triglicéridos son un índice útil de la condición nutricional. La disminución de los TRG plasmáticos se asocian con ayuno prolongado o insuficiencia hepática aguda y crónica, aunque no necesariamente se observa con valores bajo los límites de referencia. Las concentraciones de TRG plasmáticos se elevan de forma transitoria después de la administración de una dieta rica grasa, ya que los lípidos son absorbidos por el intestino y transportados al hígado para su posterior procesamiento.

Funcionalidad renal

En peces, el riñón contribuye solo parcialmente a la excreción de desechos nitrogenados, por lo que la interpretación de las concentraciones plasmáticas de urea, ácido úrico y creatinina podrían ser insuficientes para evaluar la funcionalidad renal. En general, la creatinina se forma a partir de creatina y es secretada vía renal, por lo que un aumento de la concentración plasmática de creatinina se ha asociado con enfermedad renal, aunque las concentraciones de urea muchas veces permanecen normales.

Sin embargo, las branquias son el principal órgano para la excreción de urea en la mayoría de los peces. Por lo tanto, el aumento de la concentración plasmática de urea puede ser más indicativo de una alteración de la funcionalidad branquial mas que renal en teleósteos. Dentro de los procesos patológicos que pueden alterar el funcionamiento renal está, la necrosis tubular, la anemia infecciosa del salmón (ISA), enfermedad bacteriana del riñón (BKD), piscirickettsiosis (SRS), intoxicación aguda por metales pesados, entre otras.

Funcionalidad branquial

Las branquias son fundamentales en los peces ya que aseguran las funciones de osmorregulación, respiración y excreción de algunos compuestos nitrogenados, representando una amplia superficie de intercambio con el medio. Las concentraciones plasmáticas normales de sodio y cloruro de los teleósteos de agua dulce son más bajas que la de los teleósteos marinos. Estas concentraciones se ven afectadas por los cambios en la salinidad ambiental, la función branquial y el estrés.

Pocos minutos después de la manipulación de los peces, las catecolaminas y el cortisol se liberan a la circulación sanguínea junto con la liberación de ácido láctico de los músculos. La liberación de catecolaminas inducida por el estrés provoca un aumento de la presión sanguínea que da lugar a una mayor permeabilidad electrolítica de las branquias que provoca una rápida disminución de sodio y cloruro en el pez de agua dulce y un aumento de los iones en teleósteos marinos. La hiponatremia y la hipocloremia en peces de agua dulce pueden estar asociadas con la enfermedad branquial y/o renal o con ambientes ácidos.

De esta manera, los electrolitos plasmáticos son un indicador importante en la esmoltificación, ya que son parte fundamental de la homeostasis. Durante el proceso de esmoltificación se observa un incremento paulatino de sodio y cloro con un pico previo al traslado al agua de mar, el cual se mantiene posterior al ingreso a mar hasta su aclimatación.

Los salmónidos están entre los grupos de peces con menos tolerancia al amoniaco. El amoníaco en el agua existe principalmente como amoníaco no ionizado (NH_3) e ion amonio (NH_4^+). El nitrógeno amoniacal total (TAN) es el principal producto de excreción del metabolismo de proteínas y se elimina a través de las branquias. En los sistemas productivos en que se utiliza flujo abierto de agua, el TAN no representa un problema significativo; sin embargo, en sistemas de recirculación de agua y transporte de peces, es una variable crítica.

La toxicidad del NH_3 aumenta junto con el pH, la temperatura, el ejercicio y el estrés, siendo los peces pequeños más sensibles. Hiperamonemia puede ocurrir en peces en agua dulce con daño en epitelio branquial, el cual puede ir de la mano con aumento en la concentración de urea y ácido úrico, como forma compensatoria.

Funcionalidad musculoesquelética y mineral

La estructura esquelética forma el marco básico para el crecimiento de un animal sano y los minerales son un grupo importante de nutrientes esenciales para el desarrollo esquelético. El esqueleto de los peces se compone de una matriz ósea orgánica y minerales inorgánicos, compuestos principalmente de colágeno e hidroxiapatita (HAP), respectivamente. En los peces, los huesos representan un reservorio importante y altamente conservado de calcio (Ca), fósforo (P), zinc (Zn) y manganeso (Mn). La concentración de estos minerales en las vértebras se considera los indicadores más relevantes del estado mineral y cuantifica sus necesidades dietéticas.

El P es componente estructural de los huesos, los dientes y las escamas, además de desempeñar un papel en varios procesos metabólicos. La disminución en las concentraciones de fósforo, hipofosfatemia, se asocia principalmente a la baja de ingesta en la dieta y produce una disminución de la tasa de crecimiento, reducción en la eficiencia alimenticia y deformidades óseas.

Además de reducir el contenido mineral óseo, la hipofosfatemia también ha demostrado aumentar la ALP, probablemente como un mecanismo compensatorio en la deficiencia mineral. Otras causas de hipofosfatemia son mala absorción intestinal o aumento en el aporte de calcio en la dieta. Un aumento sobre los requerimientos de P en la dieta, no se correlaciona con el aumento de P en sangre por su regulación homeostática ejercido por la vitamina D.

El Ca es el mineral más abundante en los huesos de los peces y comprende alrededor del 20-25% de la masa ósea seca. La importancia del Ca como mineral estructural en el hueso se relaciona con HAP, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, los materiales primarios de la matriz ósea, con una relación Ca:P de 1.6 a 2 en huesos de salmónidos.

La absorción de Ca desde el medioambiente dependerá de la especie, disponibilidad de Ca en el agua y suplementación en la dieta. En los teleósteos, aproximadamente el 99% de la fracción de Ca de todo el cuerpo es incorporado en huesos y escamas y además de sus funciones estructurales, juega un papel importante en la contracción muscular, hemostasis y coagulación, transmisión del impulso nervioso, integridad celular, equilibrio ácido-base y activación enzimática.

Un punto importante por considerar es la relación Ca:P, la cual varía con la etapa de vida. En salmón del Atlántico se ha observado una relación masa Ca:P de 0.2-0.4 antes de la primera alimentación, 0.86-1.04 en la etapa de crecimiento, disminuyendo a 0.6 durante y después de la esmoltificación para mantener entre 0.7-0.8 en etapa adulta. En el caso de salmónidos de agua dulce, 30-40% del total de Ca plasmático está ligado a la proteína, por lo tanto, los cambios en las proteínas plasmáticas afectarán la concentración plasmática total de Ca.

La deficiencia de Mg en trucha Arcoíris determina lesiones en columna vertebral. El aumento en el contenido de P en la dieta probablemente causado por la formación del complejo Ca-P-Mg insoluble en el intestino, inhibe la absorción de Mg y podría inducir hipomagnesemia.

Las enfermedades de tejido musculoesquelético son principalmente de tipo inflamatorio, asociadas con infecciones virales (PD o enfermedad del páncreas, HSMI o inflamación del músculo esquelético y cardiaco), infecciones bacterianas (BKD, SRS, Furunculosis atípica, Estreptococosis, Tenacibaculosis, Flavobacteriosis); y fúngicas (Phaeohyphomicosis).

Las actividades de la AST y la CK aumentan después de una lesión muscular o actividad muscular intensa asociada a hipoxia del tejido muscular. La actividad de LDH también puede estar aumentada en procesos inflamatorios agudos, producto de su implicancia en el metabolismo energético anaerobio. Por lo tanto, la concentración de lactato también podría observarse incrementado en condiciones de actividad muscular intensa y restricción de oxígeno.

Es importante considerar que la concentración plasmática de enzimas podría variar según la etapa de desarrollo. Los niveles de AST son altos durante el desove y disminuyen posteriormente, al mismo tiempo que la actividad de otras transaminasas, enzimas glucolíticas y proteínas musculares. Periodos de inanición e inactividad generan valores bajos de LDH, la cual también está positivamente correlacionada con la temperatura del agua y el pH.

CAPÍTULO 4

Gasometría sanguínea en salmónidos

Gasometría sanguínea en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara & M.A. Rozas-Serri

Los parámetros asociados al estatus ácido-base y gases sanguíneos necesitan ser medidos inmediatamente luego de colectada la muestra, lo cual genera un inconveniente técnico para trasladar las muestras al laboratorio. Sin embargo, se han desarrollado dispositivos o gasómetros portátiles (Point-of-Care) capaces de evaluar con precisión una variedad de parámetros sanguíneos relevantes en mamíferos; incluyendo gases sanguíneos y el estado ácido-base, permitiendo hacer mediciones en terreno y en un corto tiempo.

La limitación de este tipo medición son las validaciones técnicas y operacionales de los equipos para ser utilizados en peces. Los factores que pueden generar sesgos en las mediciones son la temperatura ambiente, eritrocitos nucleados, concentración de gases en sangre y el estado ácido-base que varían con $PaCO_2$, especialmente en teleósteos.

Los IR para las variables de gasometría sanguíneas definidos y descritos para salmónidos en el presente manual fueron definidos utilizando el equipo IRMA Trupoint (ITC, Edison, NJ, USA) (Figura 1). Otros equipos ampliamente utilizados en condiciones de campo son i-STAT (Abbott Point of Care, Princeton, NJ, USA) y EPOC (Siemens Healthcare Diagnostic, Malvern, PA, USA) (Figura 1).

Metodología para gasometría sanguínea

Los gasómetros están formados por un electrodo de pH, un electrodo de CO_2 y un electrodo de O_2, mediante los cuales el equipo puede medir la concentración de los analitos en sangre entera utilizando técnicas potenciométricas, amperométricas y conductimétricas (Tabla 1). Adicionalmente, los equipos pueden calcular matemáticamente, otros parámetros tales como: bicarbonato (HCO^-_3), dióxido de carbono total (TCO_2) y exceso de base.

Tabla 1. Técnicas de medición en analizadores de gases sanguíneos y pH

Sensor	Técnica de medición
pH, pCO_2	Medición potenciométrica basada en los principios del electrodo Maclnnes y Dole (para pH) y Severinghaus y Bradley (para pCO_2)
pO_2	Medición amperométrica basada en los principios del electrodo Clark
Hematocrito	Medición conductimétrica

Materiales

- La sangre debe ser colectada mediante jeringas que incluyen heparina de litio (heparinizadas) de 1, 2 ó 3 mL dependiendo de volumen de sangre a analizar (Figura 1).
- Gasómetro portátil.
- Antes de su uso del equipo los electrodos deben ser calibrados con concentraciones conocidas de buffers estándar y de soluciones calibradoras.
- La forma de calibración varía entre los diferentes equipos, por lo que se debe realizar de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Método

- Colectar sangre entera fresca arterial o venosa usando una jeringa heparinizada.
- Extraer el aire residual en la jeringa inmediatamente después de colectada la sangre. Si desea separar una parte de la muestra para otros análisis, no exponer la muestra al aire.
- Homogeneizar la muestra con giros de la jeringa para homogenizar la sangre con el anticoagulante.
- Cerrar el extremo de la jeringa para evitar el ingreso de aire que puede llevar a errores analíticos y almacenar en hielo (temperatura aproximada de 4ºC) hasta su análisis.
- El tiempo máximo transcurrido entre la toma de muestra y su posterior análisis no debe superar 2 h.
- Inyectar un volumen mínimo de 125 a 200 µL de sangre entera en la recámara para muestras del equipo.
- Cuando la sangre entra en contacto con los electrodos en la recámara se produce una salida de electricidad que corresponde a un valor de pH o a una presión parcial. Los analizadores de gases sanguíneos automáticamente monitorizan la respuesta del electrodo y luego de la estabilización, imprimen los valores medidos.
- Los equipos portátiles trabajan en un rango de temperatura entre 12 a 30° C, por lo que la temperatura ambiente en condiciones de campo durante el invierno podría ser un problema para las mediciones de gases, específicamente pO_2.
- Los equipos portátiles pueden corregir resultados de acuerdo con la temperatura corporal del individuo en el momento de la obtención de la muestra. Esto es importante porque los equipos están diseñados para su uso en individuos homeotermos, por la tanto la temperatura de trabajo es 37° C. En peces, se debe considerar la temperatura del agua antes de analizar la muestra para que mida gases sanguíneos corregidos a dicha temperatura.

Figura 1. *Equipamiento básico para realizar mediciones de gasometría sanguínea en condiciones de campo.*

Interpretación de resultados de gasometría sanguínea

Los resultados de gasometría sanguínea deben ser siempre interpretados integralmente con los antecedentes clínicos, ambientales y productivos de cada centro de cultivo. La medición de gases sanguíneos provee directamente resultados de presión parcial de CO_2 ($PaCO_2$), presión parcial de O_2 (PaO_2) y pH, con los cuales se puede calcular bicarbonato ($NaHCO_3$) y CO_2 total (TCO_2).

Presión parcial de CO_2

La $PaCO_2$ es una medida de la eficiencia de la ventilación, un indicador de la efectividad de la eliminación o excreción del dióxido de carbono o el factor de intensidad del CO_2 disuelto en el plasma. Adicionalmente, es un indicador de la cantidad de ácido carbónico presente en el plasma. Entonces, la $PaCO_2$ es un reflejo del componente respiratorio del equilibrio ácido-base.

La $PaCO_2$ se registra anormalmente elevada cuando existe un exceso de ácido carbónico en el plasma, es decir, acidosis respiratoria. Por otro lado, cuando la $PaCO_2$ se registra anormalmente baja es porque existe un déficit de ácido carbónico en el plasma, es decir, alcalosis respiratoria.

Presión parcial de O_2

La PaO_2 es el índice de oxigenación de la sangre, un indicador de la intensidad de la presencia del oxígeno molecular en solución en el plasma. Entonces, PaO_2 es la expresión de la eficiencia de la ventilación/ perfusión branquial y de la difusión para lograr la normal transferencia del oxígeno desde el interior de la laminilla hasta la sangre capilar branquial.

Potencial de hidrógeno (pH)

Es una medida para determinar el grado de alcalinidad o acidez del plasma. El pH se expresa a través de la ecuación de Henderson-Hasselbalch que define el pH en términos de la relación entre la sal y el ácido, es decir, el pH del líquido extracelular depende de la relación entre la cantidad de bicarbonato base y la cantidad de ácido carbónico; pH= pK + log $HCO\text{-}_3$/ H_2CO_3.

Entonces, el pH es una manera de expresar intensidad de acidez, aunque es realmente el indicador más importante de la severidad y de la magnitud de una alteración ácido-base que $PaCO_2$ o bicarbonato ($HCO\text{-}_3$). El pH varía de acuerdo con la relación $HCO\text{-}_3$ / $H2CO_3$, pero se establece la siguiente definición: (1) pH elevado siempre significa alcalosis y; (2) pH bajo siempre significa acidosis. Sin embargo, el pH no permite diferenciar si se trata de una acidosis respiratoria o metabólica, o de una alcalosis respiratoria o metabólica.

Bicarbonato

El $HCO\text{-}_3$ es el componente metabólico del equilibrio ácido-base, el compuesto químico que contiene casi la totalidad del CO_2 del organismo. La $PaCO_2$ es el factor de intensidad que determina la cantidad de ácido carbónico, pero el $HCO\text{-}_3$ es el factor de cantidad de CO_2. Mientras la $PaCO_2$ se refiere a CO_2 molecular disuelto en el plasma, el $HCO\text{-}_3$ se refiere a CO_2 en forma combinada.

El $HCO\text{-}_3$ es la base más importante del sistema de amortiguación o “buffer” del organismo, el cual mantiene el pH en valores normales o el equilibrio ácido-base. A pesar de que existen diversos sistemas buffer en el organismo, el pH es controlado solo por la relación $HCO\text{-}_3$ / H_2CO_3. Tomados en conjunto,

estos indicadores permiten evaluar el equilibrio ácido-base y definir el tipo de alteración en trastornos simples o mixtos.

Las alteraciones ácido-base tienen una etiología metabólica o respiratoria. El contenido de CO_2 del suero por si solo, no es el mejor indicador del equilibrio ácido-base, sino que la cantidad de $HCO\text{-}_3$. El CO_2 y $H2CO_3$ en solución contribuyen solo con unos pocos milimoles. De esta manera, se puede observar una franca acidosis o alcalosis respiratoria en la fase aguda sin que se observe una alteración en el contenido de CO_2 del plasma. Para esto, se debe medir el pH y la $PaCO_2$ en una muestra fresca de sangre.

En la práctica, se pueden presentar situaciones complejas de tipo respiratorio y/o metabólico y los valores de los gases sanguíneos pueden significar fenómenos de compensación ante la alteración primaria o bien pueden representar alteraciones primarias coexistentes. Podemos constatar:

- **Acidosis respiratoria:** $PaCO_2$ elevado, $HCO\text{-}_3$ normal o ligeramente aumentado y pH ácido.
- **Acidosis metabólica:** $HCO\text{-}_3$ disminuido, $PaCO_2$ disminuido y pH ácido.
- **Alcalosis respiratoria:** $HCO\text{-}_3$ marcadamente disminuido, $PaCO_2$ disminuido y pH alcalino.
- **Alcalosis metabólica:** $HCO\text{-}_3$ marcadamente elevado, $PaCO_2$ elevado y pH alcalino.

Dióxido de carbono total (TCO_2)

El valor mide el CO_2 total disuelto en la sangre y se determina combinando el $HCO\text{-}_3$ y la $PaCO_2$ multiplicada por un factor (generalmente 0.03) que estima la cantidad de CO_2 puro que está disuelto en su forma natural.

Finalmente, con estos indicadores también es factible calcular el exceso de base. En fisiología, el **exceso de base** se refiere a la cantidad de base requerida para volver el pH de la sangre de un individuo al valor normal. Usualmente el valor es reportado en unidades de (mEq/L) y fluctúa entre -2 y +2.

CAPÍTULO 5

Endocrinología en salmónidos

Endocrinología en salmónidos

R.Y. Walker-Vergara & M.A. Rozas-Serri

La endocrinología en peces ha tenido un impacto significativo en la comprensión de la función y evolución de varios mensajeros neuroquímicos y sistemas. De esta manera, la medición de la concentración de distintas hormonas en sangre es una herramienta rápida y útil en procesos claves como la esmoltificación, estrés y reproducción, entre otros.

Metodología para cuantificar hormonas séricas

La medición de hormonas se puede realizar en suero o plasma y, dependiendo de la hormona, se necesita de una muestra de sangre en tubos sin anticoagulante o tubos con heparina de litio. El volumen mínimo de plasma/suero es de 200 µL, el cual debe ser idealmente separado de la sangre entera antes de 12 h. La muestra puede ser mantenida a -20°C hasta su posterior análisis.

Existen varios métodos para medir la concentración de hormonas séricas, tales como métodos químicos, espectrofotométricos, cromatográficos e inmunoensayos. Los inmunoensayos se basan en una reacción antígeno-anticuerpo y, a la vez, existen varias técnicas:

- **Radioinmunoanalisis (RIA):** Se basa en una reacción antígeno-anticuerpo con isótopos radioactivos marcados. La concentración de radioactividad medida indica la concentración del analito. A pesar de que puede detectar y cuantificar concentración muy bajas de hormonas, actualmente se usa sola para mediciones específicas.
- **Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA):** Es un método que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo de manera similar a RIA, pero el marcaje se realiza con una enzima.
- **Quimioluminiscencia:** Se basa en el principio de emisión luminosa a través de una reacción enzima-sustrato. La quimioluminiscencia se basa en la emisión de luz causada por los productos de una inmunoreacción, p.e. éster de acridina, peróxido-ácido, hidróxido de sodio, fosfatasa alcalina.
- **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):** Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Es el método de elección para cuantificación de catecolaminas y hormonas esteroidales, pero tiene un costo elevado.

Perfiles hormonales en peces salmónidos

Sin perjuicio de que persisten interrogantes respecto del uso de perfiles hormonales en peces, existe consenso en la importancia del sistema neuroendocrino en la regulación de distintos procesos fisiológicos, especialmente la osmorregulación, estrés y reproducción.

Osmorregulación

Los peces eurihalinos como los salmónidos tienen la capacidad de adaptarse tanto al agua dulce (medios hipo-osmóticos) como salada (medios hiper-osmóticos), dependiendo de la fase biológica o productiva en la que se encuentran. La metamorfosis mediante el cual los peces de agua dulce cambian su fisiología para adaptarse y sobrevivir en agua salada se denomina esmoltificación (Figura 1).

El sistema osmorregulador de peces teleósteos está controlado por el sistema endocrino a través de una amplia diversidad de hormonas hipofisarias (prolactina, hormona del crecimiento, tiroideas, entre otras) y extrahipofisarias (arginina, vasotocina, urotensinas, estañocalcina, entre otras). De esta forma, la adaptación de los peces frente a cambios en la salinidad del agua produce la activación de diversos factores que intervienen en los procesos de secreción y/o absorción de iones y agua, así como su control por parte de diversas hormonas, a través de sus receptores específicos, desencadenando las rutas celulares necesarias para integrar su acción fisiológica.

Las hormonas osmorregulatorias involucradas en este proceso adaptativo se dividen en: (1) Hormonas de acción rápida y corta que regulan la actividad de las proteínas transportadoras preexistentes tales como péptido natriurético (ANP), angiotensina II, entre otras; (2) Hormonas de acción lenta y larga como prolactina y cortisol para la adaptación en agua dulce y hormona de crecimiento, hormonas tiroideas y cortisol para la adaptación en agua de mar.

La aplicación de estos marcadores neuroendocrinos como indicadores del progreso de la esmoltificación han sido ampliamente descrita y pueden complementar la medición de electrolitos plasmáticos, la actividad de la bomba Na^+K^+ ATPasa y/o la expresión de genes asociados con la osmorregulación.

Prolactina

La prolactina es una hormona promotora de la adaptación a ambientes hipo-osmóticos o agua dulce. Durante la fase de agua dulce, la prolactina estimula la secreción de mucus para reducir la pérdida de iones y agua a través de la piel, razón por la cual su concentración comienza a disminuir durante el proceso de esmoltificación y posterior traslado a mar, ya que se debe promover la captación de iones.

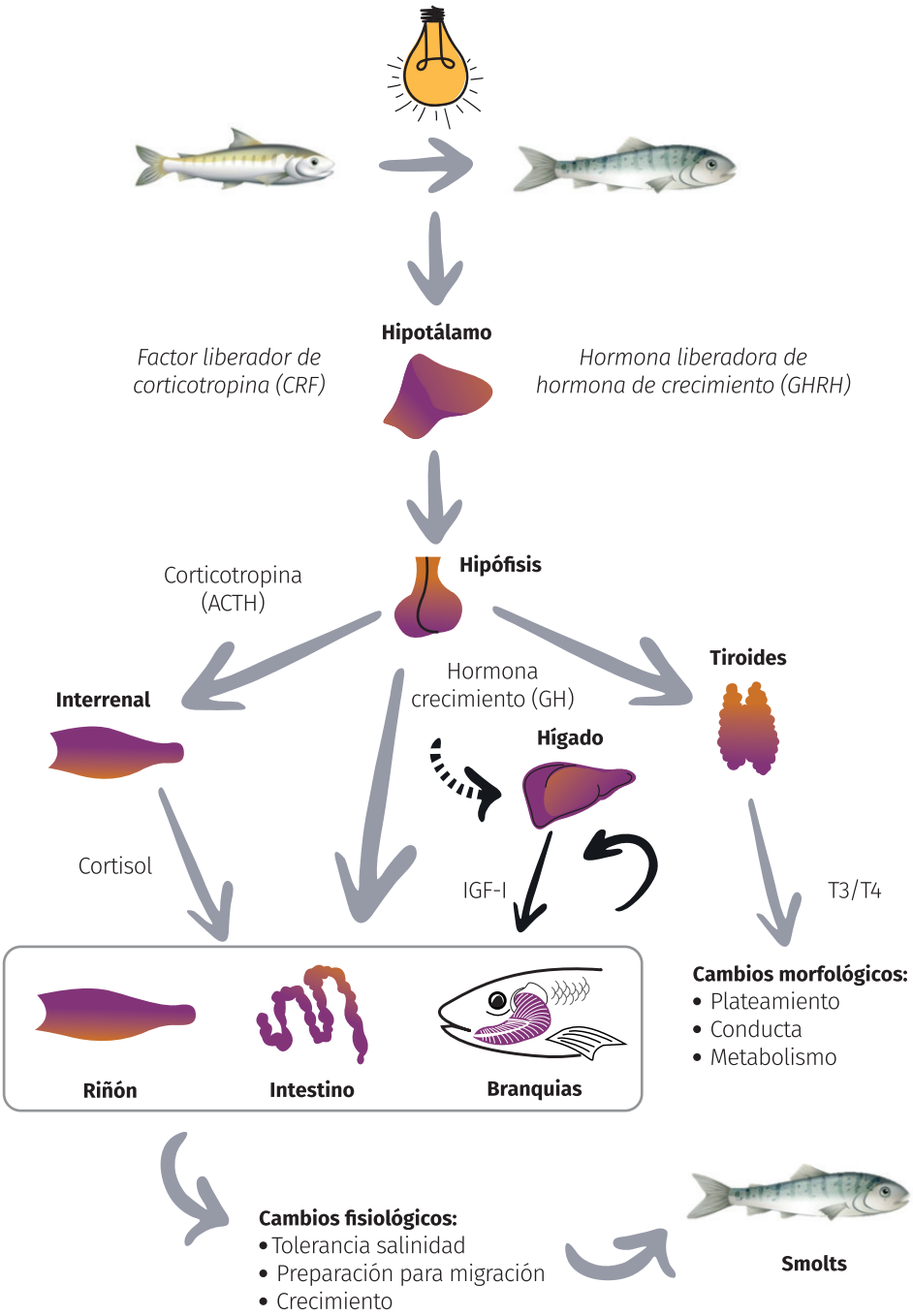


Figura 1. Esquema del control neuroendocrino en el desarrollo de smolt.

Adicionalmente, modula la permeabilidad branquial, intestinal y renal al agua, probablemente mediante la regulación de uniones estrechas, cambios en la composición de membranas y acuaporinas. Disminuye la actividad Na^+K^+ ATPasa en branquias y reduce el número y/o tamaño de células de cloruro en el epitelio branquial. A nivel renal, la prolactina estimula la reabsorción de Na^+ en los túbulos renales mediante el incremento de la actividad Na^+K^+ ATPasa, favoreciendo la adaptación en agua dulce.

Hormona de crecimiento y somatomedinas

La hormona de crecimiento (GH) tiene un rol fundamental en el crecimiento y metabolismo de vertebrados, influyendo en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. Los efectos promotores del crecimiento se refieren al crecimiento del peso (músculo) y al crecimiento de la longitud (esquelético). La GH incrementa durante la esmoltificación, antes y después del ingreso al mar, probablemente asociada con la mayor demanda metabólica para la migración y el requerimiento de mayor tolerancia de los peces al ambiente salino.

La GH puede actuar directamente sobre tejidos y órganos relacionados con la osmorregulación o indirectamente a través de las denominadas somatomedinas o factores insulínicos de crecimiento (IGF-I y IGF-II), los cuales median las acciones de la GH. Al mismo tiempo, se ha demostrado la acción sinérgica de la GH con cortisol y hormonas tiroideas.

Hormona adrenocorticótropa

La hormona adrenocorticótropa (ACTH) forma parte del denominado eje hipotalámico-hipofisario-interrenal. El factor liberador de corticotropina (CRF) estimula la secreción de la ACTH en la hipófisis anterior, la cual actúa sobre el tejido interrenal e induce la liberación de cortisol.

El cortisol es una hormona promotora de la adaptación a ambientes salinos, estimulando el crecimiento y diferenciación de células de cloruro e incrementan la actividad Na^+K^+ ATPasa en las branquias. Cuando la concentración de GH es alta y la concentración de prolactina es baja, el cortisol promueve la secreción de sales desde el pez hacia el agua.

BOX 1.

En agua dulce, la concentración de prolactina es alta hasta el inicio la de esmoltificación, momento en el cual la concentración disminuye junto con el incremento de la concentración de T_4, GH y cortisol. Los mecanismos fisiológicos neuroendocrinos son pulsátiles, por lo tanto, una sola medición en el tiempo no siempre logra entregar información consistente.

Hormonas tiroideas

La principal función de las hormonas tiroideas -Triyodotironina (T_3) y Tiroxina (T_4)- es inducir cambios morfológicos y metabólicos en los peces que se están preparando para adaptarse al mar, por lo tanto, la concentración sérica de T_3 y, especialmente de T_4, incrementa durante el proceso de esmoltificación.

El incremento de T_4 se asocia básicamente con el requerimiento de incrementar la actividad Na^+K^+ ATPasa y el número de células de cloruro. Adicionalmente, las hormonas tiroideas muestran una significativa interacción positiva con los ejes endocrinos del cortisol y GH/IGF para incrementar la capacidad de adaptación a ambientes salinos en salmónidos y no-salmónidos.

Respuesta estrés

En general, la acuicultura ha ido incorporando gradualmente el concepto de bienestar animal. El consenso es que un animal cuenta con bienestar si se desarrolla en un medio acuático adecuado, si está sano, bien nutrido, sin malestar físico y/o térmico, si puede expresar formas innatas de comportamiento y si no padece sensaciones desagradables de dolor o miedo. De esta manera, el bienestar animal se entiende como el bajo o nulo nivel de estrés en condiciones de producción, transporte o sacrificio.

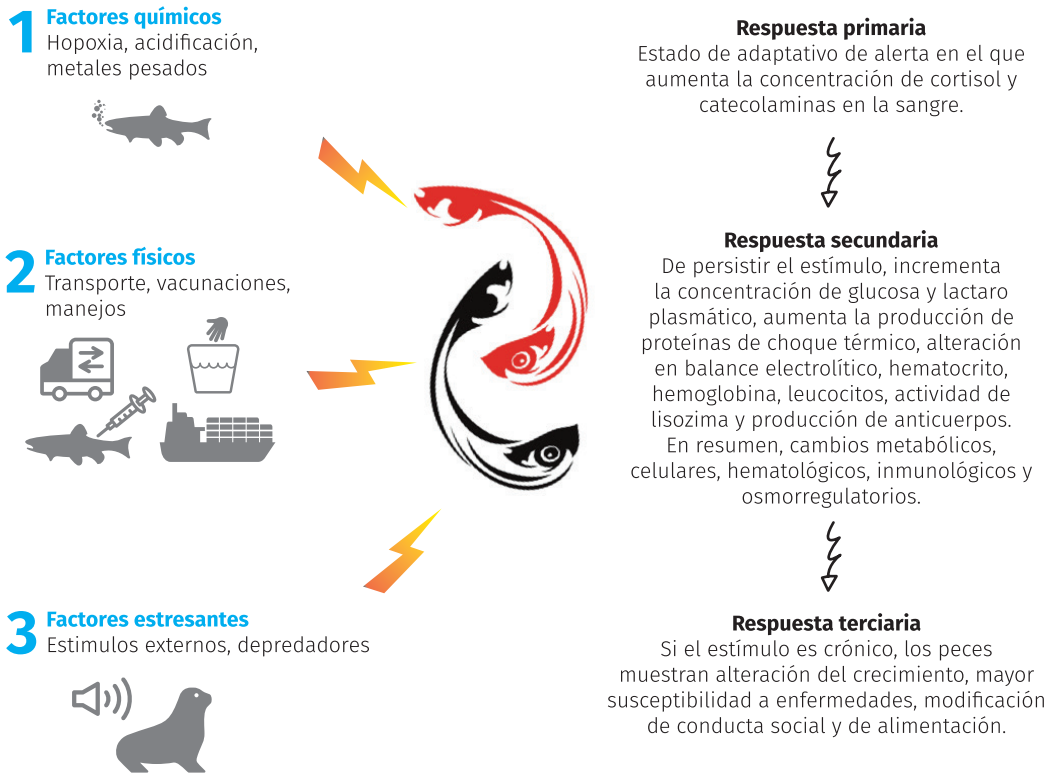


Figura 2. Eventos estresantes y respuesta al estrés en peces.

Los principales eventos de estrés en los peces se relacionan con el hacinamiento, el traslado, vacunación y el cambio de agua dulce a salada, la cosecha, entre otros. El estrés crónico es el principal efecto negativo del cultivo intensivo de peces, ya que afecta el sistema inmunológico. Por lo tanto, el bienestar animal favorece directamente la productividad y rentabilidad de la acuicultura a través de la obtención de un producto de mejor calidad y, en consecuencia, mejor precio y mayor aceptación del consumidor.

La respuesta al estrés en peces puede ser clasificada como primaria, secundaria o terciaria (Figura 2). Cuando se somete a un pez a un estrés agudo (biometrías, vacunaciones, transporte, etc), se registra un aumento inmediato en las catecolaminas y cortisol, cuya concentración máxima varía dependiendo del tiempo de exposición y la intensidad del estrés.

Cuando el agente estresante persiste, se clasifica como estrés crónico y se observada principalmente en la respuesta secundaria (glucosa) y terciaria (lactato) al estrés (Figura 2). En este caso, la medición de cortisol tiene menos poder diagnóstico que en estrés agudo, sin embargo, estudios recientes indican que la medición de cortisol en escamas podría ser una herramienta importante para la evaluación de estrés crónico.

El cortisol es la hormona que se utiliza para cuantificar los niveles de estrés en condiciones productivas, aumentando en situaciones tales como captura, alta densidad, manipulación, ejercicio intenso, incorporación de tóxicos, cambios en la salinidad, pH, temperatura, entre otros. Un aumento en los niveles de cortisol se asocia a una respuesta a un estímulo estresante agudo y junto con indicadores de respuesta secundaria y terciaria (glucosa, lactato), permite evaluar la intensidad del estrés.El cortisol incrementa la gluconeogénesis en el hígado, promueve la actividad de la enzima glucógeno sintetasa para sintetizar glucógeno rápidamente, aumenta la actividad proteolítica en músculo blanco, aumenta los niveles de aminoácidos en plasma, interfiere en los centros neurales de saciedad, disminuye la absorción de nutrientes en el intestino, disminuye el número de receptores celulares para la GH, disminuye la cantidad de receptores para estrógenos en el hígado afectando también la síntesis de vitelogenina y disminuye la respuesta inmune.

Adicionalmente, cuando los peces perciben un agente estresante, las señales neuronales activan el hipotálamo para sintetizar ACTH, la cual inicia la activación descendente de las fibras simpáticas que estimulan las células cromafines del riñón para liberar las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina a la circulación sanguínea. Las catecolaminas preparan al pez para responder al agente estresante aumentando la gluconeogénesis y glucogenólisis, la degradación lipídica, entre otras.

BOX 2.

La respuesta primaria es adaptativa y dirigida por la liberación de catecolaminas y cortisol. Si el factor estresante persiste, se activa la respuesta secundaria caracterizada por cambios metabólicos, hematológicos, celulares, osmorregulatorios e inmunológicos. Finalmente, la respuesta terciaria se caracteriza por alteraciones en los patrones de comportamiento y del rendimiento productivo de los peces.

Reproducción

Los peces tienen una alta sensibilidad a factores ambientales, los cuales ejercen un importante control sobre la reproducción. En peces, como en todos los vertebrados, la reproducción es regulada por el cerebro a través de la hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) que se produce específicamente en el hipotálamo (Figura 3). Este decapéptido estimula la producción de gonadotrofinas (GtH) por parte de la hipófisis o pituitaria. En algunos peces la dopamina es un inhibidor negativo de la producción y liberación de GtH por parte de la hipófisis.

La hipófisis ejerce el control sobre la reproducción a través de la hormona folículo estimulante (FSH), que regula la vitelogénesis en hembras y la espermatogénesis en los machos, y la hormona luteinizante (LH), encargada de controlar la maduración final del oocito en las hembras (Figura 3). Las condiciones de cultivo afectan más significativamente a hembras que a machos, ya que los machos parecen adaptarse mejor a las condiciones de cultivo y son capaces de madurar y producir gametos viables con mayor facilidad.

Durante la vitelogénisis en las hembras, la FSH o LH estimulan la producción de testosterona en las células de la teca y su aromatización a 17ß-estradiol (E_2) en las células de la granulosa del folículo ovárico (Figura 3). El incremento de E_2 en el plasma estimula la producción de vitelogenina (VGT) en el hígado, la que es reconocida por receptores de membrana e incorporada por el oocito a través de micropinocitosis, proceso que es regulado por la FSH. Al final de la vitelogénesis incrementan los niveles plasmáticos de LH que produce un aumento de los niveles plasmáticos del esteroide inductor de la maduración (MIS), el cual actúa en la membrana del oocito induciendo su maduración final (Figura 3).

En machos, las gonadotrofinas regulan la espermatogénesis a través de la producción de andrógenos por las células de Leydig en el testículo, específicamente de la 11 -ketotestosterona (11-KT). Se registra un aumento significativo de los niveles plasmáticos de 11-KT durante la espermatogénesis y una disminución antes o durante el periodo de espermiación. La acción de la 11-KT llega finalmente a estimular las células de Sertoli que son las encargadas de activar la espermatogénesis.

El incremento de los niveles plasmáticos de LH al comienzo del desove induce un aumento en la esteroidogénesis, además de la producción de MIS. Luego, LH y MIS inducen el incremento en la producción de semen a través de la estimulación de la producción del plasma seminal. Finalmente, MIS estimula la capacidad de movimiento de los espermatozoides mediante el incremento del pH del plasma seminal.

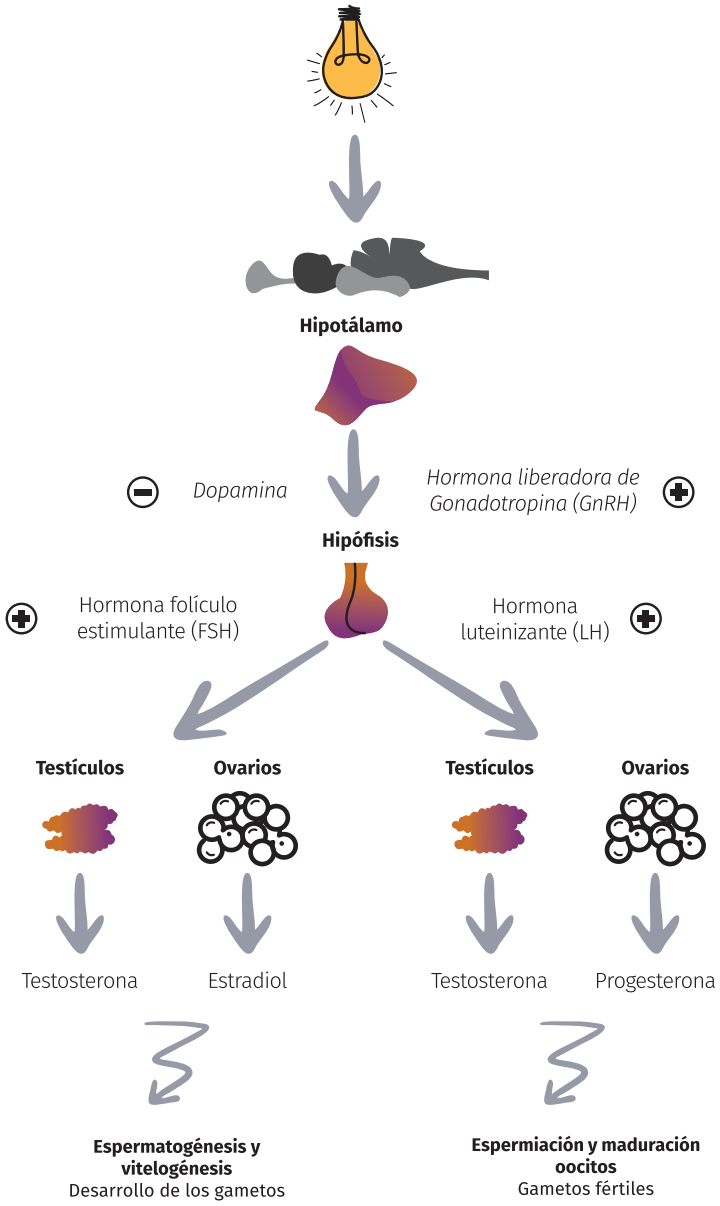


Figura 3. Representación esquemática del eje reproductivo en peces, componentes principales y fases, control ambiental y endocrino.

Referencias

1. Baeverfjord G, Antony Prabhu P, Fjelldal PG, Albrektsen S, Hatlen B, Denstadli V, Ytteborg E, Takle H, Lock EJ, Berntssen MH, Lundebye AK, Åsgård T, Waagbø R. 2019. Mineral nutrition and bone health in salmonids. Rev Aquacult 11: 740-765.
2. Barton A. 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. Integr and Comp Biol, 42(3): 517–525.
3. Brauner C, Randall D. 1998. The linkage between oxygen and carbón dioxide transport. In SF Perry II, BL Tufts, eds, Fish Physiology, Vol. XVII: Fish Respiration. Academic Press, San diego, pp 283-320.
4. Burtis CA. 2007. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6ª ed. Saunders, USA, Pp 1104.
5. Cadwell S, Rummer, J Brauner J. 2006. Blood samplig techniques and storage duration: efects on the presence and magnitude of the red blood cell B-adrenergic response in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. Com Biochem Physiol a Mol Inegr Physiol, 162: 94-100.
6. Campbell, Ellis.2007. Avian, Exotic Animal Hematology Citology. Third Edition. Blackwell, Pp93.
7. Campbell T. 2017. Exotic animal hematology and cytology. 4ª ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp 424.
8. DiMaggio M, Ohs CL, Petty BD. 2010. Evaluation of a Point-of-Care Blood Analyzer for Use in Determination of Select Hematological Indices in the Seminole Killifish. N Am J Aquacult, 72:3, 261-268.
9. Duman M, Saticioglu IB, Suzer B., Altun S. 2019. Practices for Drawing Blood Samples from Teleost Fish. North Am J Aquaculture, 81: 119-125.
10. Fraser D, Weary DM, Pajor EA, Milligan BN. 1997. A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. Animal Welfare, 6: 187-205.
11. Fregeneda-Grandes J, Hernandez-Navarro S, Fernandez-Coppe I, Correa-Guimaraes A, Ruíz- Potosme N, Navas- Gracia L, Aller-Gancedo M, Martín-Gil F, Martín-Gil J. 2013. Seasonal and sex related variations in serum steroid hormone leves in wild and farmed Brown trout Salmo trutta L. in the north-west of Spain. J Water Health, 11: 720-728.
12. Gallagher A, Frick L, Bushnell P, Brill R, Mandelman J. 2010. Blood gas, oxygen saturation, pH, and lactate values in elasmobranch blood measured with a commercially available portable clinical analyzer and standard laboratory instruments. J Aquat Anim Health, 22: 229-234
13. Harrenstien LA, Tornquist SJ, Miller-Morgan TJ, Fodness BG, Clifford KE. 2005. Evaluation of a point-of-care blood analyzer and determination of reference ranges for blood parameters in rockfish. J Am Vet Med Assoc, 226: 255-65.
14. Harter T, Shartau R, Brauner C, Farrell A. 2014. Validation of the i-STAT system for the analysis of blood parameters in fish. C Physiology, 2: 1-12.
15. Haugland GT, Jordal AEO, Wergeland HI. 2012. Characterization of Small, Mononuclear Blood Cells from Salmon Having High Phagocytic Capacity and Ability to Differentiate into Dendritic like Cells. PLOS ONE 7(11): e49260.
16. Herrera E. 2004. Perfil metabólico de Salmón Atlántico Salmo salar y Trucha Arcoiris *Oncorhynchus mykiss* de tres pisciculturas en fase de agua dulce en el sur de Chile. Memoria de título, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
17. Hossain MD, Yoshimatsu T. 2014. Dietary calcium requirement in fishes. Aquacult Nutr, 20: 1-11.
18. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 2008. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6ª ed. Academic Press, USA, Pp 928.
19. Mancera J, Mc Cormick SD. 2007. Role of Prolactin, Growth Hormone, Insulin-like Growth Factor I and Cortisol in Teleost Osmoregulation In: Fish Osmoregulation. Ed. B.G. Kapoor, Science Publishers. Pp 497-515.

20. McCornick SD, O´Dea M, Moeckel A, Thrandur B. 2003. Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery release. Aquaculture, 222:D 45-57.
21. McCormick S. 2013. Smolt Physiology and Endocrinology. In: Fish Physiology, Eurhaline fishes, 1st ed, Academic Press, Elsevier Inc. Pp199-251.
22. Neiffer DL, Stamper MA. 2009. Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs, ILAR journal, Oxford University Press.24. Olabuena SE. 2000. Fish Immune System. Gayana (Concepc.), vol.64, n.2, pp.205-215.
23. Noro M, Wittwer F. 2012. Hematología de Salmonídeos. 1ª Ed. Imprenta America, Chile. Pp 45.
24. Olabuena SE. 2000. Fish Immune System. Gayana (Concepc.), vol.64, n.2, pp.205-215.
25. Preston AC, Taylor JF, Fjelldal PG, et al. 2017. Effects of temperature on feed intake and plasma chemistry after exhaustive exercise in triploid brown trout (Salmo trutta L). Fish Physiol Biochem, 43: 337–350.
26. Rozas-Serri MA, Ildefonso R, Peña A, Enríquez R, Barrientos S, Maldonado L. 2017. Comparative Pathogenesis of Piscirickettsiosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt experimentally challenged with LF-89-like and EM-90-like *Piscirickettsia salmonis* isolates. *J Fish Dis* 40, 1451-1472.
27. Rozas-Serri M, Lobos C, Correa R, Ildefonso R, Vásquez J, Muñoz A, Maldonado L, Jaramillo V, Coñuecar D, Oyarzún C, Walker R, Navarrete C, Gayosa J, Mancilla P, Peña A, Senn C and Schwerter F (2020) Atlantic Salmon Pre-smolt Survivors of Renibacterium salmoninarum Infection Show Inhibited Cell-Mediated Adaptive Immune Response and a Higher Risk of Death During the Late Stage of Infection at Lower Water Temperatures. Front. Immunol. 11:1378. doi: 10.3389/fimmu.
28. Tavares-Dias M. 2006. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. J Fish Biol, 68: 1822 - 1833.
29. Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, DeNicolla D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G. 2012. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.
30. Valdevenito I. 2005. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. Arch Med Vet, 40: 115-123.
31. Vargas-Chacoff L, Muñoz J, Hawes C, Oyarzún R, Pontigo J, Saravia J, González MP, Morera FJ, Labbé BS, Bertrán C, Mardones O, Pino., Wadsworth S. 2016. Atlantic salmon *(Salmo salar)* and Coho salmon *(Oncorhynchus kisutch)* display differential metabolic changes in response to infestation by the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*. Aquaculture, 464: 469-479.
32. Vielma J, Lall S. 1998. Control of phosphorus homeostasis of Atlantic salmon *(Salmo salar)* in fresh water. Fish Physiol Biochem, 19: 83–93.
33. Weiss DJ, Wardrop KJ. 2010. Schalm´s Veterinary Hematology. 6ª ed. Wiley-Blackwell, USA, Pp 1232.
34. Witeska M. 2015. Anemia in teleost fishes. Anemia in teleost fishes. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 35(4): 148-160.
35. Wittwer F. 2012. Manual de patología clínica veterinaria, 2nd Ed. Imprenta América, Valdivia, Chile.
36. World Organization of Animal Health. 2008. Introduction to the recommendations for animal welfare, Article 7.1.1. Pages 235-236 in Terrestrial Animal Health Code 2008. World Organization for Animal Health (OIE), Paris, Francia.
37. Zinkl, J. G., Cox, W. T., & Kono, C. S. 1991. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. Comp Haematol Int. 1(4): 187–195.

Anexo 1

Muestras sanguíneas para los distintos análisis en peces salmónidos.

Análisis	Tipo de muestra		Tubo colecta	Observaciones	
	1ra opción	Otras		Inteferencias	Otros
BIOQUÍMICA					
PROTEINAS TOTALES	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA	Hemólisis	
ALBUMINA	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA	Hemólisis	
COLESTEROL TOTAL	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA		
HDL	Suero	Plasma	S.A, Hep		
LDL	Suero	Plasma	S.A, Hep		
TRIGLICERIDOS	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA		
BILIRRUBINA (Total o Directa)	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA	"Hemólisis Evitar luz directa"	"El uso de plasma EDTA puede provocar valores ligeramente disminuidos"
GLUCOSA	Plasma	-	NaF, Hep		Separar < 1 hr (muestra Hep)
LACTATO	Plasma	-	NaF, Hep	Hemólisis	Separar < 1 hr (muestra Hep). Transportar en agua/hielo o en unidad refrigerante.
CREATININA	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA	Hemólisis	
UREA	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA, NaF	Hemólisis	
ÁCIDO ÚRICO					
AMONIO	Plasma		EDTA	Hemólisis	Separar < 20 min. Transportar en agua/hielo o en unidad refrigerante.
ALT/GPT	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA	Hemólisis	
AST/GOT	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA	Hemólisis	
GGT	Suero	Plasma	S.A, Hep, EDTA	Hemólisis	
FOSFATASA ALC. (ALP)	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis	
α-AMILASA	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis	
LIPASA	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis	
CK TOTAL	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis	
LDH	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis	
Ca	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis, Lipemia	
P	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis, Lipemia	
Fe	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis, Lipemia	
Mg	Suero	Plasma	S.A, Hep	Hemólisis, Lipemia	
HORMONAS					
PROGESTERONA	Suero	Plasma	S.A, Hep		
CORTISOL	Suero	Plasma	S.A, Hep		
T3	Suero	Plasma	S.A, Hep		
T4	Suero	Plasma	S.A, Hep		
TESTOSTERONA	Suero	Plasma	S.A, Hep		
ELECTROLITOS					
Na, Cl, K	Plasma	Suero	S.A, Hep	Hemólisis, Lipemia	Solo con heparina de litio
GASES					
ph, Gases anguineos.	Sangre		"Jeringa heparinizada"		"jeringa no debe contener burbujas de aire. Si la muestra no se procesa dentro de los 5 minutos siguientes a su recogida: - Extraiga todo el aire de la jeringuilla. - Bloquee o cierre el extremo del dispositivo de recogida Almacene la muestra en hielo
HEMATOLÓGICO					
Hemograma	Sa-Hep	San-EDTA	Hep, EDTA	"Evitar formación de coágulos"	Mezclar la muestra con el anticoagulante por inversión (mín 8 vecces
Eritrograma					
Leucograma					
Trombocitos					

Sa-Hep: sangre heparinizada
S.A: sin anticoagulante; Hep: Heparina de litio; EDTA: ácido etilendiaminotetracético; NaF: fluoruro sódico.

Anexo 2
Hematología

Parámetro	Unidad	Trucha Arcoíris			Salmón del Atlántico			Salmón Coho		
		Pre smolt-smolt	Post smolt	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Smolt	Post smolt - Adulto	Reproductor
Eritrocitos	10^6 cél/µL	0,6 - 1,3	0,8 - 1,3	0,6 - 1,3	0,6 - 1,3	0,6 - 1,1	0,5 - 1,1	0,7 - 1,3	0,6 - 1,2	0,7 - 1,7
VGA	%	37 -60	39 - 74	40 - 72	30 - 58	33 - 59	36 - 62	38 - 67	35 - 68	42 - 70
HB	g/L	44,7 - 95,0	63,1 - 139,1	42,7 - 99,0	41,3 - 108,6	53,6 - 111,0	52,1 - 135,9	48, 0 -113,8	50,8 - 100,0	78,6 - 138,8
VCM	fL	376,5 - 798,7	347,3 - 735,7	320,0 - 743,6	250,9 - 747,9	392,5 - 773,6	363,6 - 732,0	239,2 - 766,4	399,1 - 775,6	288,6 - 723, 1
CHCM	g/L	100,0 -198,9	110,3 - 259,9	102,9 - 235,0	111,9 - 210,8	112,5 - 201,9	107,2 - 281,0	81,7 - 212,5	91,0 - 209,6	141,4 - 293,6
Leucocitos	cel/µL	6544 - 24149	5486 - 10315	5210 - 24023	4653 - 21290	4547 - 21414	6695 - 23693	5189 - 24278	4689 - 23572	3070 - 20923
Monocito	%	0 - 3	0 - 2	0-3	0-4	0-4	0 - 4	0 - 4	0 - 4	0 -2
	cel/µL	0 - 680	0 - 206	0 - 660	0 - 720	0 - 431	0 - 417	0 - 741	0 - 694	0 - 389
Linfocito	%	68 - 86	69 - 89	68 - 86	54 - 88	60 - 82	68 - 88	69 - 89	66 - 88	72 - 92
	cel/µL	5320 - 17500	3785 - 9180	4340 - 18200	3869 - 17193	2781 - 15499	5068 - 18896	3020 - 19732	2566 - 19027	2579 - 16749
Eosinofilo	%	0 - 1	0	0	0	0 - 1	0-1	0	0 - 1	0
	cel/µL	0 - 194	-	-	-	0 - 119	0-11	-	0 - 170	-
Heterofilo	%	15 - 30	4 - 19	16 - 33	12 - 33	18 - 38	12 - 31	11 - 31	12 - 32	8 - 28
	cel/µL	722 - 5928	219 - 1960	868 - 6080	749 - 4530	807 - 6051	1213 - 5468	914 - 5730	532 - 6194	391 - 5159
Trombocitos	cel/µL	2120 - 11853	2257 - 5725	3415 - 12985	2183 - 12966	1144 - 15700	5295 - 14220	3512 - 18735	5399 - 24615	4600 - 5686

Anexo 3
Bioquímica

Parámetro	Unidad	Trucha Arcoíris			Salmón del Atlántico			Salmón Coho		
		Pre smolt-smolt	Post smolt	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Smolt	Post smolt - Adulto	Reproductor
Proteínas totales	g/L	22,0 - 24,3	30,2 -60,5	20,4 - 61,7	28,0 - 65,0	29,0 - 59,4	41,9 - 72,0	27,0 - 56,8	29,3 - 57,7	33,9 - 74,8
Albúmina	g/L	9,2 - 21,7	12,3 - 24,5	7,6 - 27,2	11,4 - 25,0	13,2 - 23,3	15,8 - 28,2	11,2 - 22,0	11,6 - 22,0	10,7 - 29,0
Globulinas	g/L	14,2 - 35.4	15,6 - 38,4	12,1 -45,4	9,4 - 48,4	12,8 - 39,0	26,0 - 45,2	12,3 - 37,8	13,6 - 38,8	18,2 - 45,7
Colesterol	mmol/L	3,1 - 15,9	2,1 - 12,9	2,4 - 21,3	11,4 - 25,0	3,0 - 13,9	6,7 - 19,0	3,4 - 14,1	2,8 - 14,0	2,5 - 18,7
HDLmmol/L	0,3 - 7,1	0,6 - 4,4	0,1 - 7,6	1,1 - 8,9	0,9 - 8,7	0,3 - 13,3	0,5 - 6,7	0,2 - 8,0	0,1 - 0,6	
LDLmmol/L	0,4 - 12,5	0,6 - 7,2	0,1 - 12,2	1,0 -6,4	0,5 - 2,9	0,9 - 8,7	0,2 - 4,3	0,6 - 5,4	0,1 -7,0	
Triglicéridos	mmol/L	1,6 - 14,8	1,5 - 9,3	2,4 - 19,8	1,7 - 8,8	1,0- 6,6	1,5 - 7,3	1,0 - 6,5	0,5 - 5,9	0,9 - 4,7
Lactato	mmol/L	2,3 - 15,0	1,9 - 9,9	1,4 - 15,5	3,1 - 11,3	1,9 - 10,9	1,7 - 6,4	1,3 - 13,2	2,8 - 10,1	2,0 - 10,9
Glucosa	mmol/L	1,0 - 9,4	1,2 - 12,2	< 19,6	3,5 - 11,5	1,4 - 8,1	1,2 - 12,5	1,8 - 12,1	< 12,6	< 13,8
BILT	µmol/l	<4,4	<4,1	<5,1	<3,8	< 5,3	*	2,5 - 4,7	< 5,2	<4,1
BILD	µmol/l	<3,4	<2,2	<3,2	<2,4	<3,5	*	1,6 - 3,7	< 3,3	<3,1
ALT	U/L	5,4 - 36,1	5,3 - 32,8	<24	6,4 - 37,6	5,5 - 37,5	<17	5,2 - 44,5	< 33,2	<30
AST	U/L	107 - 612	117 - 589	<877	210 - 626	106 - 546	<665	52 - 588	120 - 590	<775
ALP	U/L	21,5 - 226	23 - 221	<84	106 - 277	79,0 - 282	<283	18,9 - 115	13 - 184	<72
LDH	U/L	367 - 2708	264 - 2007	<1884	436 - 3827	240 - 3419	<3171	250 - 2350	268 - 1738	<766
CK	U/L	< 19212	< 23518	<17221	< 25524	< 16915	<26352	< 16256	< 22944	<8300
Lipasa	U/L	3,9 - 16,0	3,2 - 7,7	5,4 - 7,2	2,8 - 7,4	2,1 - 9,1	5,0 - 7,8	4,2 - 22,5	4,1 - 7,4	6,9 - 11,0
Amilasa	U/L	160 - 1652	419 - 1916	<1799	380 - 1492	387 - 2026	<1668	20 -2366	261 - 2727	<2090
Creatinina	µmol/l	< 52,9	< 55,7	<58,9	< 41,6	< 45,8	<52,8	<54,4	< 51,0	*
Urea	mmol/L	0,8 - 1,5	1,0 - 1,8	0,5 - 1,4	0,7 - 1,8	0,6 - 2,7	0,9 - 2,6	1,3 - 2,3	0,5 - 2,1	0,5 - 0,8
Ácido úrico	µmol/l	<83,7	<36,0	<48,3	<43,3	<23,3	<40,5	<26,9	<44	<77
NH3	mmol/L	<2,2	<2,2	< 2,1	< 2,4	<2,4	< 1,4	< 3,7	< 3,0	<1,3
Calcio	mmol/L	2,30 - 4,93	3,17 - 3,88	1,65 - 7, 38	2,38 - 4,58	2,00 - 4,03	1,85 - 3,73	1,38 - 3,05	1,90 - 4,35	3,00 - 9, 00
iCa	mmol/L	0,7- 1,6	1,2-1,9	0,4-1,7	0,2-0,6	0,6-1,6	0,6-1,2	0,4-1,4	0,2-1,4	0,5-1,4
Magnesio	mmol/L	1,03 - 2,01	1,06 - 2,01	0,66 - 2,75	1,19 - 3,21	0,74 - 3,53	1,11 - 2,88	0,8 - 3,2	0,70 - 2,01	0,82 - 2,01
Hierro	µmol/l	2,3 - 22,4	5,9 - 18,6	5,91 - 26,42	11,60 - 34,67	4,51 - 19,49	2,74 - 31,67	4,85 - 50,81	4,94 - 29,82	2,47 - 20,69
Fósforo	mmol/L	4,83 - 10,27	6,12 - 10,37	1,61 - 9,79	4,35 - 12,20	2,83 - 12,24	3,51 - 12,20	7,21 - 11,98	4,12 - 7,82	3,09 - 6,73
Sodio	mmol/L	134 - 182	131 - 180	134,2 - 182,3	148 - 186	148 - 190	126,5 - 164,0	142 - 169	137 - 169	153,9 - 165,7
Potasio	mmol/L	0,7 - 8,5	1,0 - 9,5	0,5 - 11,2	1,1 - 7,4	0,9 - 9,7	0,6 - 9,2	1,2 - 13,3	1,1 - 16,4	1,1 - 7,3
Cloro	mmol/L	102 - 147	101 - 152	95,5 - 129,3	111 - 159	118 - 163	95,5 - 129,3	108 - 149	105 - 151	119,6 - 130,3
Osm NaCl	mmol/L	139 - 284	212 - 300	218 - 295	238 -306	246 - 331	203 - 266	231 - 286	222 - 299	105 - 269

*: Resultados obtenidos menores al límite de detección de la técnica.

Anexo 4

Gases

		Trucha Arcoíris		Salmón del Atlántico			Salmón Coho	
Parámetro	Unidad	Pre smolt-smolt	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Post smolt	Reproductor
pH		7,03 - 7,45	7,21 - 7,54	7,13 - 7,46	7,02 - 7,56	7,24 - 7,64	7,28 - 7,54	7,17 - 7,47
pCO2	mmHg	14,0 - 24,8	12,0 - 29,8	11,6 - 29,5	11,7 - 20,6	11,2 - 21,9	7,8 - 17,1	16,0 - 25,8
HCO-3	mmol/L	4,9 - 14,2	8,4 - 21,4	8,7 - 14,4	6,7 - 10,5	8,3 - 13,6	5,3 - 9,8	12,6 - 16,7
TCO2	mmol/L	5,3 - 14,9	9,1 - 23,2	9,5 - 15,1	7,9 - 11,6	8,8 - 14,3	5,6 - 10,3	14,0 - 18,3

Anexo 5

Hormonas

		Trucha Arcoíris			Salmón del Atlántico			Salmón Coho		
Parámetro	Unidad	Pre smolt-smolt	Post smolt Adulto	Reproductor	Pre smolt-smolt	Post smolt-Adulto	Reproductor	Pre Smolt-Smolt	Post smolt - Adulto	Reproductor
Cortisol	ng/mL	8,1 - 98,2	7,0 - 116,6	8,4 - 411,4	2,2 - 102,4	0,4 - 212,6	9,2 - 241,5	37,9 - 162,3	0,8 - 232,6	18,0 -379,7
T3	nmol/L	0,7 - 28,5	*	1,8 - 47.8	11,5 - 22,2	24,2 -62,2	3,3 - 88,8	3,7 - 17,3	1,9 - 22,0	4,9 - 76,5
T4 total	nmol/L	5,2 - 11,2	*	5,8 - 72,5	7,0 - 85,4	5,1 -24,5	3,6 - 38,7	*	-	*
Testosterona	ng/mL	0,01 - 0,3	*	0,04 - 8,4	*	*	*	<2,0	<1,8	*
Progesterona[a]	ng/mL	-	-	0,04 - 0,4	-	-	<0,3	-	-	0,1 - 1,8

T3: triyodotironina; T4: tiroxina total
a: Hormona medida solo en reproductores
*: 80% o más de los valores menores al limite de detección de la prueba, no es posible determinar intervalo de referencia.

Anexo 6

Factores de conversión al sistema internacional de unidades S.I.U.

Parámetro	Unidad Convencional	Factor	Unidad S.I
Acido Úrico	mg/dL	60	µmol/L
Albúmina	g/dL	10	g/L
Amonio	ug/dL	0,587	µmol/L
Bilirrubina directa	mg/dL	17,1	µmol/L
Bilirrubina total	mg/dL	17,1	µmol/L
Calcio	mg/dL	0,25	mmol/L
Cloruro	mEq/L	1	mmol/L
Colesterol	mg/dL	0,026	mmol/L
Colesterol HDL	mg/dL	0,026	mmol/L
Colesterol LDL	mg/dL	0,026	mmol/L
Cortisol	ug/dL	27,6	nmol/L
Creatinina	mg/dL	88,4	µmol/L
Fierro	µg/dL	0,179	µmol/L
Fosfato i.	mg/dL	0,323	mmol/L
Glucosa	mg/dL	0,056	mmol/L
Hemoglobina	g/dL	10	g/L
Lactato	mg/dL	0,111	mmol/L
Magnesio	mg/dL	0,411	mmol/L
Potasio	mEq/L	1	mmol/L
Progesterona	ng/mL	3,19	nmol/L
Proteinas total	g/dL	10	g/L
Sodio	mEq/L	1	mmol/L
Testosterona	ng/mL	3,46	nmol/L
Tiroxina: T4	ug/dL	12,87	nmol/L
Triyodotironina: T3	ng/dL	0,015	nmol/L
Triglicéridos	mg/dL	0,0113	mmol/L
Urea	mg/dL	0,167	mmol/L

pathovet®
LABORATORIO

ISBN: 978-956-401-932-1

Elanco™

www.elancoaquaglobal.com

La presente versión del manual Patología Clínica en Salmónidos ha sido auspiciada por Elanco.