



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
VETERINARIA**

Valores hematológicos de referencia en cercetas pardillas juveniles (*Marmaronetta angustirostris*)

Alumno: Lydia Cabo Zaragoza
Tutor: José Sansano Maestre
Curso académico 2021-2022



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a todas aquellas personas que me han apoyado incondicionalmente desde que decidí emprender esta carrera y que han seguido formando parte de ella durante todo el camino. Gracias a mis padres, por confiar ciegamente en mí e inculcarme desde pequeña la valentía, el respeto, la constancia, el amor y la pasión por todo aquello que hacemos cueste lo que cueste, pero siempre con la humildad por delante. Gracias a mi novio, por apoyarme, motivarme y cuidarme en cada paso de este intenso recorrido.

En segundo lugar, expresar mi reconocimiento a los profesores que he tenido durante toda mi trayectoria, por aportar ese granito de arena y hacer que crezca profesionalmente día a día. A mis amigos, ¡qué orgullosa estoy de haber compartido tanto juntos! Habernos encontrado en esta etapa de mi vida ha sido lo mejor que me podría haber pasado. Y mi más sincero y especial agradecimiento a mi director del trabajo fin de grado, José Sansano Maestre, por su plena disposición, entusiasmo y por apostar por mí en este proyecto tan importante.

Finalmente, manifestar mi gratitud tanto al Centro de Recuperación “El Saler”, por apoyarme y abrirme las puertas de sus instalaciones permitiendo llevar a cabo este proyecto (en especial a Josep Lerma Penella y a Francisco Javier Cegarra Martínez por su disposición y ayuda en el manejo durante la extracción sanguínea), como al personal de laboratorio en la sede Santa Úrsula de la UCV, por proporcionarme los materiales necesarios para el desarrollo del estudio.

¡Gracias de corazón, por tanto apoyo y tanto cariño!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. CREACIÓN DE PARÁMETROS DE REFERENCIA	6
1.2. CERCETA PARDILLA	7
2. OBJETIVO	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y UBICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	10
3.2. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS	10
3.3. TÉCNICAS EMPLEADAS	12
3.3.1. <i>Determinación del hematocrito</i>	12
3.3.2. <i>Proteínas totales</i>	13
3.3.3. <i>Determinación de la concentración de hemoglobina</i>	14
3.3.4. <i>Recuento del total de glóbulos rojos</i>	14
3.3.5. <i>Recuento del total de glóbulos blancos</i>	15
3.3.6. <i>Frotis sanguíneo y recuento diferencial de glóbulos blancos</i>	17
3.3.6.1. Tinción Diff-Quick	17
3.3.6.2. Tinción Wright	18
3.3.7. <i>Medición de células sanguíneas</i>	19
3.3.8. <i>Determinación de índices eritrocitarios</i>	19
3.4. REGISTRO DE DATOS	20
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
4. RESULTADOS	21
4.1. RESULTADOS DE LA SERIE ROJA	21
4.1.1. <i>Parámetros hematológicos</i>	21
4.1.2. <i>Morfología eritrocitaria en frotis sanguíneo</i>	22
4.1.3. <i>Medición de eritrocitos</i>	23
4.2. RESULTADOS DE LA SERIE BLANCA	23
4.2.1. <i>Recuento total de glóbulos blancos</i>	23
4.2.2. <i>Morfología leucocitaria en frotis sanguíneo y diferencial de glóbulos blancos</i>	23
4.2.2.1. Tinción Wright	24
4.2.2.2. Tinción Diff-Quick	25
4.2.3. <i>Medición de leucocitos</i>	27
4.3. RESULTADOS DE TROMBOCITOS	28

4.4. RESULTADOS DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE REFRACTOMETRÍA	29
5. DISCUSIÓN	30
5.1. PARÁMETROS SERIE ROJA	30
5.1.1. Valor hematocrito (<i>Hto</i>)	30
5.1.2. Recuento total de glóbulos rojos (<i>RBC</i>).....	31
5.1.3. Hemoglobina (<i>Hb</i>)	31
5.1.4. Índices eritrocitarios	32
5.1.4.1. Volumen corpuscular medio (<i>VCM</i>).....	32
5.1.4.2. Hemoglobina corpuscular media (<i>HbCM</i>).....	32
5.1.4.3. Concentración de hemoglobina corpuscular media (<i>CHCM</i>)	32
5.2. PARÁMETROS SERIE BLANCA	32
5.2.1. Recuento total de glóbulos blancos (<i>WBC</i>).....	32
5.2.2. Diferencial de glóbulos blancos.....	33
5.2.2.1. Eosinófilos	33
5.2.2.2. Basófilos	34
5.2.2.3. Heterófilos y linfocitos	34
5.2.2.4. Monocitos	34
5.3. IDENTIFICACIÓN CELULAR	35
5.4. MEDICIONES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	35
5.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE REFRACTOMETRÍA	35
6. CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS.....	38
ANEXOS.....	I
ANEXO I: DIAGRAMAS DE CAJAS Y BIGOTES DE LEUCOCITOS EN TINCIÓN DIFF-QUICK Y EN TINCIÓN WRIGHT . I	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciación de un eosinófilo y heterófilo en anseriformes	4
Figura 2: Puntos más comunes de extracción sanguínea en aves.	6
Figura 3: Dibujo esquemático de las características de la cerceta pardilla.....	7
Figura 4: Cajas empleadas para el transporte de ejemplares.	10
Figura 5: Toma de muestras en cerceta pardilla.....	11
Figura 6: Lector del valor hematocrito de la muestra.....	13
Figura 7: Ejemplo de medición de proteínas totales mediante refractómetro manual	13
Figura 8: Partes del Hemoglobinómetro portátil HemoCue Hb 201+ DM analyzer.....	14
Figura 9: Recuento total de glóbulos rojos en la cámara de Neubauer.....	15
Figura 10: Colocación de los 10 µL de la muestra homogeneizada en la cámara de Neubauer.	16
Figura 11: Recuento total de glóbulos blancos en la cámara de Neubauer.....	16
Figura 12: Frotis realizado mediante la técnica “slide-to-slide o push-slide”	17
Figura 13: Morfología eritrocitaria en frotis sanguíneo.....	22
Figura 14: Identificación de células blancas en tinción Wright.....	25
Figura 15: Identificación de células blancas en tinción Diff-Quick.....	26
Figura 16: Ejemplo de mediciones realizadas en células blancas	28
Figura 17: Trombocitos en frotis sanguíneo.	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Procedimientos recomendados para la creación de valores de referencia	7
Tabla 2: Fórmulas empleadas para la obtención de los índices eritrocitarios	19
Tabla 3: Resultados serie roja	21
Tabla 4: Coloración de eritrocitos según tinción	22
Tabla 5: Mediciones eritrocitarias	23
Tabla 6: Recuento total de glóbulos blancos	23
Tabla 7: Recuento diferencial de glóbulos blancos en tinción Wright.....	24
Tabla 8: Forma en la que se tiñó cada célula con tinción Wright	24
Tabla 9: Recuento diferencial de glóbulos blancos con tinción Diff-Quick	25
Tabla 10: Forma en la que se tiñó cada célula blanca con tinción Diff-Quick.....	26
Tabla 11: Medición de leucocitos	27
Tabla 12: Forma en la que se tiñeron los trombocitos según la tinción	29
Tabla 13: Mediciones de trombocitos	29
Tabla 14: Valores obtenidos para proteínas totales	29

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

BAS	Basófilos
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
DQ	Tinción Diff-Quick
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EOS	Eosinófilos
GB	Glóbulos blancos
GR	Glóbulos rojos
Hb	Hemoglobina
HbCM	Hemoglobina corpuscular media
HET	Heterófilos
Hto	Valor hematocrito
KH ₂ PO ₄	Fosfato dipotásico
LINF	Linfocitos
MON	Monocitos
<i>n</i>	Tamaño muestral empleado
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
PT	Proteínas totales
RBC	Recuento total de glóbulos rojos
SD	Desviación estándar
SI	Sistema Internacional
VCM	Volumen corpuscular medio
W	Tinción Wright
WBC	Recuento total de glóbulos blancos

GLOSARIO DE UNIDADES

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
céls	Células
fL	Femtolitros
G	Gauge (calibre de aguja hipodérmica)
g	Gramos
g/dL	Gramos por decilitro
mL	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
μL	Microlitro
μm	Micras (micrómetros)
Nº	Número
nm	Nanómetro
pg	Picogramos

RESUMEN

La hematología es una técnica de diagnóstico muy útil para detectar patologías en los animales, especialmente en las aves, que enmascaran los signos clínicos hasta que el proceso está muy desarrollado. Resulta fundamental tener valores de referencia con los que comparar los resultados obtenidos. La cerceta pardilla (*Marmaronetta angustirostris*) es la especie de anátida más amenazada de Europa. Al no disponer de base de datos previos, el objetivo de esta investigación fue establecer los valores hematológicos de referencia en ejemplares juveniles aparentemente sanos de cercetas pardillas pertenecientes al programa de cría "LIFE Cerceta Pardilla". Se estudiaron un total de 35 ejemplares juveniles a partir de la extracción de 1 mL de sangre de la vena yugular derecha. Las técnicas utilizadas para el hemograma fueron: hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, índices eritrocitarios, trombocitos, recuento de glóbulos blancos y diferencial de glóbulos blancos en tinción Diff-Quick y en tinción Wright. Se realizaron mediciones celulares y se determinaron las proteínas totales. De todos esos valores se obtuvo: la media y mediana correspondiente, la desviación estándar y el intervalo de confianza del 95%. No hubieron diferencias significativas entre ambas tinciones utilizadas para el recuento diferencial de glóbulos blancos, el EDTA no fue válido para esta especie y los linfocitos fueron los leucocitos más abundantes. Se establecieron los valores hematológicos de referencia convirtiéndose en una herramienta indispensable para la conservación de la especie y de su entorno extrapolándose a futuros estudios sobre esta misma especie u otras de la familia de las anátidas.

Palabras clave: *anátida, hematología, Marmaronetta angustirostris, programa de cría, conservación.*

ABSTRACT

Hematology is a very useful technique helping diagnose pathologies in animals, especially in birds, which mask clinical signs until the process is well developed. It is essential to have reference values to compare the results obtained. The marbled teal (*Marmaronetta angustirostris*) is the most endangered duck species in Europe. As there was no previous database available, the objective of this research was to establish the hematological reference values in apparently healthy juvenile specimens of marbled teal, belonging to the "LIFE Marbled Teal" breeding program. Thanks to blood collection 1 mL of blood from the right jugular vein were studied from 35 juvenile specimens. The techniques applied for the complete blood count were: hematocrit, hemoglobin, total erythrocyte concentration, erythrocyte indices, thrombocytes, total leukocyte count, and differential leukocyte count in Diff-Quick staining and Wright staining. Furthermore, cell sizes and total proteins were settled. From all these values, the corresponding mean and median, standard deviation and 95% confidence interval were obtained. There were no significant differences between both stains used for the differential leukocyte count, EDTA was not valid for this species and lymphocytes were the most abundant leukocytes in blood. The hematological reference values were established, becoming an essential tool for the marbled teal conservation and its environment, being deducted in future studies on this same species or others belonging to the Anatidae family.

Key words: *Anatidae*, *hematology*, *Marmaronetta angustirostris*, *breeding program*, *conservation*.

1. INTRODUCCIÓN

La hematología es el estudio de la sangre, siendo una herramienta diagnóstica fundamental para la detección temprana de enfermedades aviares, ya que la gran mayoría de aves no suelen mostrar signos clínicos hasta que la enfermedad ha avanzado significativamente (Clark et al., 2009). Asimismo, permite evaluar la respuesta a la terapia del individuo, el pronóstico de la enfermedad y monitorizar el progreso del animal (Samour, 2005).

Cabe destacar que la hematología aviar presenta una serie de características que la distinguen de la hematología en mamíferos. Sobre todo se deben de tener en cuenta las siguientes particularidades: las aves presentan eritrocitos maduros nucleados, trombocitos nucleados en lugar de plaquetas y heterófilos en lugar de neutrófilos (Campbell & Joshua, 1984). Debido a la presencia de eritrocitos y trombocitos nucleados se deben realizar las técnicas manualmente en el laboratorio, ya que si se utilizan sistemas automáticos no homologados conllevan errores en los resultados (Sánchez-Torres et al., 2021).

La evaluación del hemograma aviar incluye datos cuantitativos y cualitativos mediante la identificación de células sanguíneas por citología, cálculo de índices eritrocitarios, mediciones celulares, cantidad total de hemoglobina en sangre, porcentaje de eritrocitos presentes y el recuento de glóbulos rojos y glóbulos blancos por microlitro de sangre (Campbell, 1994). ¿Qué es la sangre y para qué se utiliza un hemograma? La sangre es un tejido que contiene una parte líquida llena de componentes celulares. El hemograma es una técnica que permite evaluar estos componentes celulares de la sangre pertenecientes tanto a la serie roja (eritrocitos) como a la serie blanca (leucocitos) y a los trombocitos. Además, permite valorar su correcto funcionamiento y las posibles alteraciones morfológicas que pueden aparecer en su composición (Sánchez-Torres et al., 2021). Pero, ¿cómo se identifican dichas células y cómo se diferencian unas de otras? En primer lugar, los eritrocitos presentan generalmente una forma ovalada y un núcleo situado en el centro de la célula con la misma forma. En segundo lugar, los leucocitos aviares incluyen granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y células mononucleares (linfocitos y monocitos) (Jones, 2015). Se distinguen como granulocitos aquellas células que contienen diversos gránulos citoplasmáticos. Los heterófilos son los granulocitos encontrados de forma más frecuente en la sangre periférica y presentan una forma irregular con un núcleo que no está lobulado. También son células irregulares los eosinófilos, pero normalmente presentan un núcleo bilobulado. Y el tercer tipo de granulocitos que se pueden encontrar son los basófilos. Éstos siguen siendo células irregulares con un único lóbulo en el núcleo y

contienen unos gránulos citoplasmáticos muy oscuros que le aportan el color basófilo característico a la célula. Dentro de los leucocitos aviares, también encontramos las células mononucleares. Estas células pueden ser de dos tipos: linfocitos y monocitos. Los linfocitos se encuentran de forma más frecuente en el organismo y varían según su tamaño (de pequeño a grande). Tienen una forma de redonda a triangular con un núcleo grande en el centro, dejando entrever parte del citoplasma a su alrededor (Clark et al., 2009). Sin embargo, los monocitos son células de gran tamaño, redondos y con un núcleo en forma de riñón. En tercer y último lugar, tenemos los trombocitos que suelen estar agrupados, contienen un núcleo ovalado en su interior y suelen ser pequeños y ovalados (Samour, 2005); no se suelen contar por su tendencia a aglomerarse, haciendo que su recuento sea muy difícil e impreciso de lograr (Campbell & Grant, 2022).

A pesar de estas generalidades, la clase Aves presenta grandes diferencias en cuanto a la morfología y características de tinción de las células sanguíneas. Por ejemplo, Cotter (2021) señala que el principal inconveniente de la hematología en anátidas es la dificultad de diferenciar eosinófilos de heterófilos correctamente, ya que ambos son células polimorfonucleares. A propósito de facilitar esta diferenciación, se ha establecido que los heterófilos presentan bastones en forma de huso, de forma alargada y elipsoidal, mientras que los eosinófilos contienen bastones redondos a ovalados (Campbell, 1994) representados en la Figura 1. También se han descrito fisiológicamente heterófilos de distintos tamaños con tinción incompleta de gránulos nucleares o citoplasmáticos en anátidas aparentemente sanas (Clark et al., 2009). En la mayoría de aves, los linfocitos son los leucocitos secundarios más abundantes en la sangre después de los heterófilos (Pranoto & Nugrahalia, 2020).

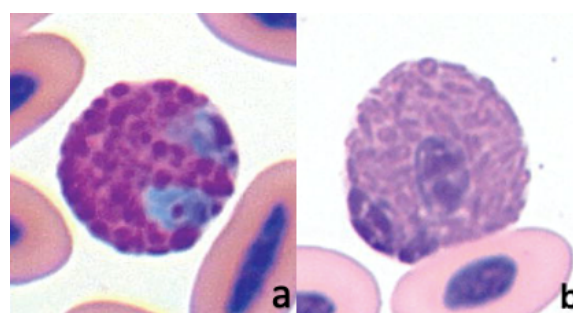


Figura 1: Diferenciación de un eosinófilo y heterófilo en anseriformes:
a) eosinófilo y b) heterófilo (Brooks et al., 2022)

Las técnicas hematológicas básicas que deben realizarse manualmente son las siguientes: determinación del hematocrito, proteínas totales, concentración de hemoglobina, recuento total de glóbulos rojos y glóbulos blancos, frotis sanguíneo y recuento diferencial de glóbulos blancos con tinción Diff-Quick y tinción Wright, medición de células sanguíneas y cálculo de índices eritrocitarios.

La determinación del hematocrito sirve para estimar el número de eritrocitos presentes en la muestra y con las proteínas totales estimar los niveles totales de proteínas presentes en sangre. Con la concentración de hemoglobina podemos medir el promedio de hemoglobina en los glóbulos rojos del animal, ya que la hemoglobina es una proteína presente en el interior de los glóbulos rojos que transporta oxígeno (Campbell & Joshua, 1984). El recuento total de glóbulos rojos y glóbulos blancos mediante la cámara de Neubauer sirve para obtener con precisión el recuento directo de eritrocitos y leucocitos en aves y detectar anomalías en estadíos tempranos. Sin embargo, para el recuento de glóbulos blancos también existe una técnica que consiste en estimaciones de leucocitos por campos, pero que no es recomendable, porque resulta más imprecisa y con mayor margen de error, ya que se pueden superponer áreas y duplicar células contadas (Campbell & Grant, 2022). En el frotis sanguíneo se evalúa la morfología de los glóbulos blancos y rojos (Jones, 2015); se cuentan y se clasifican 100 glóbulos blancos de acuerdo a la tinción y a las características morfológicas para obtener el recuento diferencial de la muestra. Además, se identifican artefactos para no confundirlos con posibles células y se evalúa la presencia o ausencia de hemoparásitos (Clark et al., 2009). La tinción Diff-Quick es una de las tinciones más utilizadas en veterinaria para teñir citologías y células sanguíneas en frotis. Gracias a esta tinción, se ha podido observar con mayor exactitud los núcleos de las células sanguíneas, especialmente glóbulos blancos. Por otro lado, la tinción de Wright se ha utilizado frecuentemente para teñir frotis de muestras sanguíneas y poder diferenciar mejor las células presentes. Con esta técnica se ha podido observar con mayor exactitud los gránulos en los leucocitos granulocíticos como los heterófilos, eosinófilos o basófilos. Por otro lado, la medición de células sanguíneas permite comparar los intervalos obtenidos con otras especies aviares, ya que el tamaño entre especies varía bastante (Campbell & Grant, 2022). Finalmente, se emplean los índices eritrocitarios para establecer diagnósticos diferenciales entre los distintos tipos de anemia (Samour, 2005).

Se recomienda la extracción de sangre procedente de las venas del animal para lograr unos resultados óptimos en las técnicas hematológicas, ya que si se obtiene de capilares podría ocasionar artefactos y células distribuidas de forma anormal. Para favorecer la interpretación sanguínea, la sangre debe recolectarse en tubos de heparina o EDTA que actúan como anticoagulantes; hay ciertos anticoagulantes que interfieren en la interpretación de las células causando hemólisis, aglomeraciones y fallos en la tinción en algunas especies (Campbell, 1994). En la Figura 2 se pueden observar los puntos más comunes de extracción sanguínea en aves que son: vena yugular derecha, vena basilar (localizada en la superficie ventral de la articulación húmero-radial-cubital) y vena metatarsiana medial (Campbell & Grant, 2022). Sin embargo, el lugar elegido depende del tamaño y

las peculiaridades de la especie, la preferencia del recolector, el volumen de sangre necesario para el estudio y la condición física del ave (Campbell & Ellis, 2007).

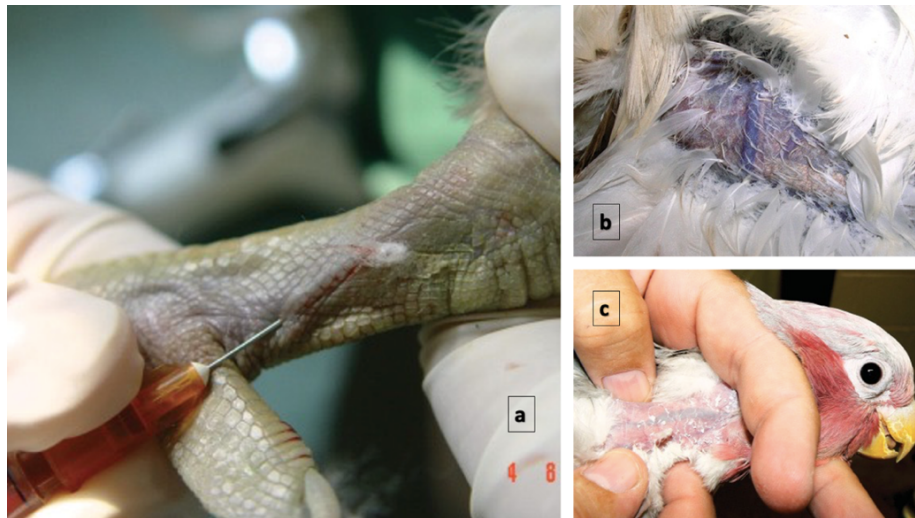


Figura 2: Puntos más comunes de extracción sanguínea en aves: a) vena metatarsiana medial, b) vena basilar y c) vena yugular derecha (Clark et al., 2009)

1.1. CREACIÓN DE PARÁMETROS DE REFERENCIA

La creación de bases de datos de hematología resulta indispensable para establecer valores de referencia para distintas especies aviarias (Samour, 2005). No obstante, estos valores pueden verse afectados sobre todo en animales sanos pertenecientes a la fauna silvestre por la edad, el sexo, la estación, situaciones patológicas, el entorno e influencias hormonales del animal (Jones, 2015; Prokić et al., 2019). Esta información puede ser útil para la conservación de la propia especie, para su manejo y para la evaluación indirecta de la calidad del hábitat en el que se encuentra (Meño-Sánchez et al., 2016). La finalidad de la creación de valores de referencia es reflejar las especies que se ven frecuentemente y no tan frecuentemente en la práctica clínica, ya que según la especie los valores de referencia difieren (Cray, 2015; Gaspar et al., 2021).

Según Friedrichs et al. (2012) para crear intervalos de referencia en distintas especies es esencial seguir los procedimientos recomendados según el tamaño y la distribución del estudio, como se pueden observar a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Procedimientos recomendados para la creación de valores de referencia (Adaptado de Friedrichs et al., 2020)

Tamaño muestral	Distribución de la información	Confirmación estadística
> 120	No se puede realizar	Intervalos de referencia no paramétricos generados para al menos un 90% de confianza con límites máximos y mínimos.
40 < x < 120	Distribución Gaussiana	Intervalos de referencia paramétricos o robustos generados para al menos un 90% de confianza con límites máximos y mínimos.
	Distribución No Gaussiana	
20 < x < 40	Distribución Gaussiana	Intervalos de referencia paramétricos o robustos generados para al menos un 90% de confianza con límites máximos y mínimos.
	Distribución No Gaussiana	
10 < x < 20	No se puede realizar, tamaño de muestra insuficiente	No se puede calcular, no se pueden establecer valores de referencia con tamaños muestrales inferiores a 20

Distribución Gaussiana: distribución normal/paramétrica, Distribución No Gaussiana: distribución no paramétrica/fuera de lo normal

1.2. CERCETA PARDILLA

La cerceta pardilla (*Marmaronetta angustirostris*) es una especie anseriforme que pertenece a la familia Anatidae y a la subfamilia Anatinae (Ministerio de Medio Ambiente, 2006). Es de pequeño tamaño, con un plumaje moteado característico, posee una zona oscura alrededor de los ojos y una cresta en la nuca como vemos representada en la Figura 3 (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico [MITECO] 2022).

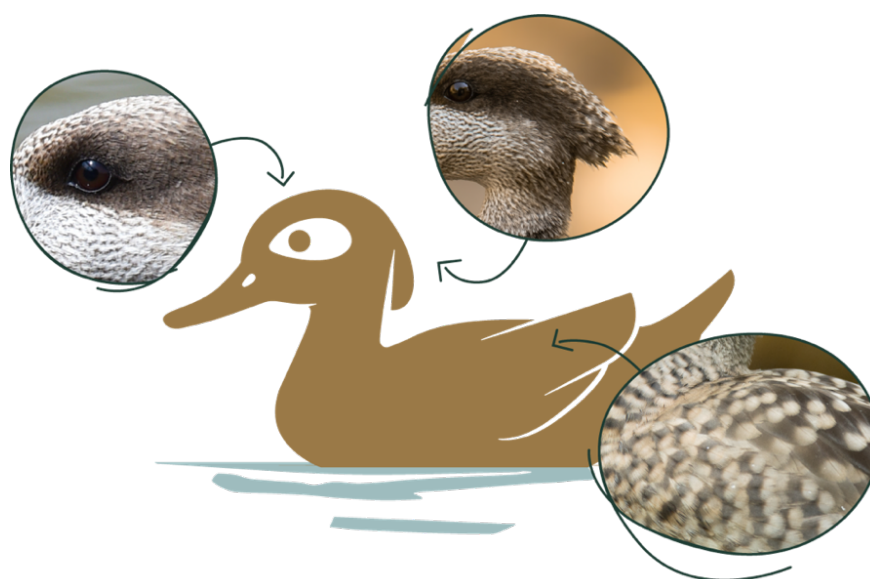


Figura 3: Dibujo esquemático de las características de la cerceta pardilla (MITECO, 2022)

Marmaronetta angustirostris está incluida en la categoría “En Peligro de Extinción” en el Catálogo Español de Especies Amenazadas. Los dos núcleos principales encargados de su reproducción y conservación en España son: el núcleo andaluz (Marismas del Guadalquivir) y el núcleo valenciano (Humedales del Baix Vinalopó) (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014). Gracias a los esfuerzos de conservación puestos en marcha en los últimos años, la especie muestra una tendencia positiva (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico [MITECO] 2021).

Visto que la mayor amenaza para la extinción de la especie es el ecosistema en el que se encuentra, se estima que un 50% del hábitat ha sido destruido en el siglo XX (BirdLife International, 2021). Por este motivo, hasta 2025 se prevé mejorar el estado de conservación de inmensas hectáreas de humedales para revertir el riesgo de extinción de la cerceta pardilla gracias al proyecto LIFE “Acciones coordinadas para la recuperación de la Cerceta Pardilla (*Marmaronetta angustirostris*)” y lograr conservar uno de los patos más emblemáticos de España y a su vez uno de los ecosistemas más importantes del planeta: los humedales (MITECO, 2021). Actualmente, aún mostrando una tendencia positiva, está categorizada como vulnerable en la Red List (BirdLife International, 2021); por tanto, es de inmensa importancia establecer valores de referencia para la cerceta pardilla, facilitando su conservación, su desarrollo, identificación de patologías y su efectiva reproducción.

2. OBJETIVO

A la vista de los antecedentes expuestos y al no disponer de base de datos previos para la cerceta pardilla (*Marmaronetta angustirostris*) ni estudios relacionados con esta ave amenazada, el objetivo del presente estudio es el siguiente:

- Establecer los valores hematológicos de referencia en cercetas pardillas juveniles (*Marmaronetta angustirostris*) aparentemente sanas pertenecientes al programa de cría “LIFE Cerceta Pardilla” en el Centro de Recuperación de Fauna “La Granja” de El Saler.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y UBICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron ejemplares juveniles de cerceta pardilla (*Marmaronetta angustirostris*) aparentemente sanos en el momento de la extracción sanguínea. No se pudo distinguir sexo ya que estos animales no presentan dimorfismo sexual. Todos ellos procedentes del Centro de Recuperación de Fauna “La Granja” de El Saler en Valencia (Comunidad Valenciana) y pertenecientes al programa de cría “LIFE Cerceta Pardilla” de España para conservar a uno de los patos más emblemáticos del país. El programa se encarga de reproducir ejemplares de cerceta pardilla en óptimo estado para luego liberarlos en distintos humedales rehabilitados de toda la Comunidad Valenciana, que sufrían previamente de contaminación, sequía y amenazas humanas (MITECO, 2022). Dicho centro realiza desde el año 2000 experiencias de cría con la cerceta pardilla (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014).

3.2. TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Con el fin de evitar periodos de estrés innecesarios en los animales, se aprovechó el momento del anillamiento previo a la liberación para realizar al mismo tiempo la extracción sanguínea. Los trabajadores responsables del manejo pertenecientes al programa de cría de las cercetas pardillas en el Centro de Recuperación de Fauna “La Granja” de El Saler capturaron previamente los ejemplares mediante redes de mano, al encontrarse en un recinto enjaulado, y se trasladaron a la zona de manipulación en cajas de dos individuos como se puede ver en la Figura 4.



Figura 4: Cajas empleadas para el transporte de ejemplares (Elaboración propia)

Desde la captura a la extracción transcurrió un periodo de 30 minutos. Durante ese periodo los ejemplares permanecieron en las correspondientes cajas con las luces del área de manipulación apagadas y en silencio para favorecer el bienestar animal en la posterior toma de muestra. Tras el anillamiento del animal, la extracción sanguínea se llevó a cabo en la vena yugular derecha y se realizó sin anestesia. Se escogió la vena yugular derecha para la extracción por ser de mayor calibre en aves (Campbell & Ellis, 2007). Se requirieron dos personas para realizarla: una, encargada de la sujeción del animal, sosteniéndolo en decúbito lateral izquierdo con las alas y las patas inmovilizadas con la mano derecha y la cabeza inmovilizada con la mano izquierda como se aprecia en la Figura 5, y la otra, encargada de la venopunción en la vena yugular derecha (Sakas & Bauck, 2002). Se localizó previamente la zona a puncionar, indicada en la Figura 5, y se desinfectó con alcohol.

La venopunción de la vena yugular derecha, ilustrada en la Figura 5, proporcionó la recolección de un mayor volumen en el menor tiempo posible, siempre evitando la formación de hematomas con un correcto manejo (manteniendo inmóvil al animal para evitar lastimarlo durante el procedimiento) y con una adecuada compresión con gasa estéril tras la extracción sanguínea (Campbell & Ellis, 2007). Para que el animal estuviera tranquilo en el momento de la extracción, los ojos del animal permanecieron tapados durante la manipulación y al encontrarse el animal más relajado con los ojos tapados y completamente quieto, se pudo favorecer su bienestar y la toma de muestras observándose también en la Figura 5.

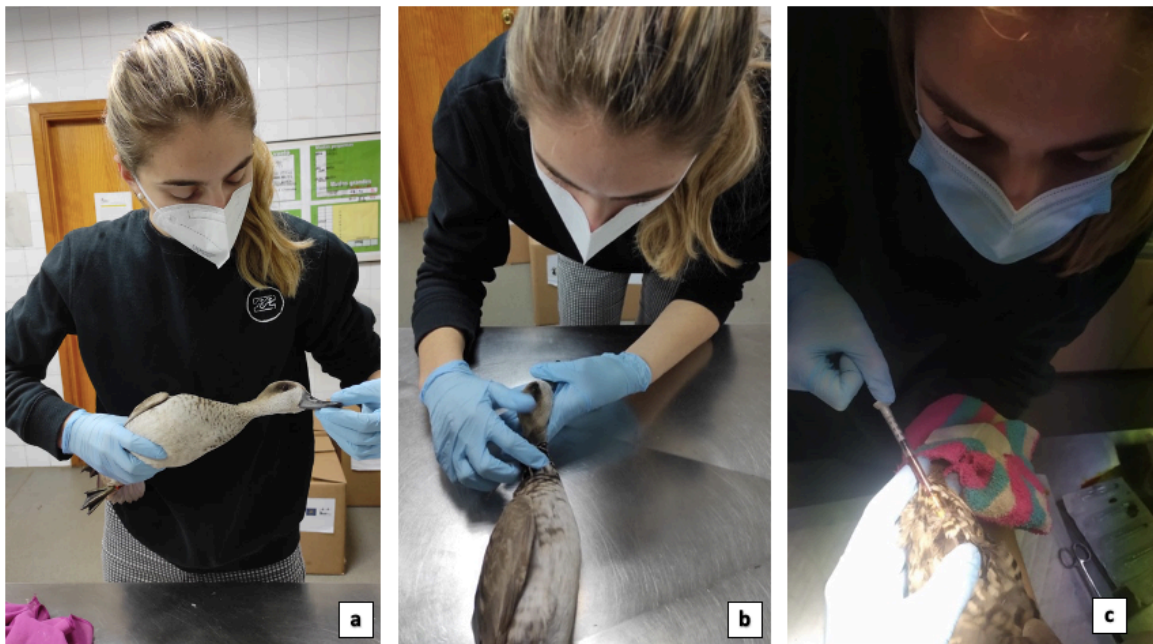


Figura 5: Toma de muestras en cerceta pardilla: a) manejo correcto para la inmovilización de la cerceta pardilla, b) localización de la vena yugular derecha y c) venopunción de la vena yugular derecha (Elaboración propia)

De cada animal se obtuvo 1 mL de sangre venosa mediante el uso de una jeringa de insulina (1 mL) con aguja hipodérmica de 25G x 1. Se introdujo 0,5 mL de la muestra en dos tubos con anticoagulante (heparina y EDTA) y seguidamente se homogeneizó. Todas las muestras obtenidas se mantuvieron a temperatura de refrigeración (entre 4 y 8°C) hasta el análisis de las mismas dentro de las 12 horas siguientes a su recolección. Para la interpretación de las muestras en los laboratorios de la sede Santa Úrsula de la Universidad Católica de Valencia, éstas se sacaron 10 minutos antes para depositarlas en un homogeneizador.

3.3. TÉCNICAS EMPLEADAS

Con la toma de muestras se obtuvieron valores para hematocrito (%), proteínas totales (g/dL), hemoglobina (g/dL), recuento de glóbulos rojos ($\times 10^6$ céls/ μ L), recuento de glóbulos blancos ($\times 10^3$ céls/ μ L), diferencial de glóbulos blancos (%) en tinción Diff-Quick y en tinción Wright, mediciones celulares (μ m) y determinación de los índices eritrocitarios. Todos los valores se generaron en el laboratorio polivalente de la sede Santa Úrsula de la Universidad Católica de Valencia el mismo día de la extracción.

3.3.1. Determinación del hematocrito

Se realizó la técnica del microhematocrito con la que se pudo estimar el porcentaje de la sangre del animal que correspondía a células sanguíneas. Gracias a ella se pudieron detectar procesos de deshidratación, anemias o policitemias en animales.

Para llevar a cabo esta técnica se usó la sangre total almacenada en tubos con heparina como anticoagulante tras ser homogeneizada, esto fue muy importante porque el uso de tubos con sangre no heparinizada podría causar una aglomeración celular y una mala separación durante la centrifugación (Sakas & Bauck, 2002). Se llenó aproximadamente $\frac{3}{4}$ de la capacidad de un capilar de hematocrito por muestra. Y se selló uno de los extremos del capilar con plastilina. Se colocaron los capilares en la centrífuga (PrO-Analytical centrifuge CR 2000R Centurion Scientific Ltd) a trece mil revoluciones por minuto durante 5 minutos con la parte que fue sellada hacia el exterior y opuestos los capilares los unos de los otros para equilibrar las muestras y compensar la centrifugación (Samour, 2005). Pasados los 5 minutos se leyeron las muestras en el lector de hematocrito representado en la Figura 6. Para ello se colocó el capilar en el centro del lector y se dejó la parte de la plastilina fuera de la medición y se determinó el valor correspondiente al observar donde cortaba la línea de los glóbulos

rojos. Ese valor fue el porcentaje de glóbulos rojos respecto al total de sangre que tuvo la muestra del animal. Este proceso se repitió con todas las muestras obtenidas (Samour, 2005).

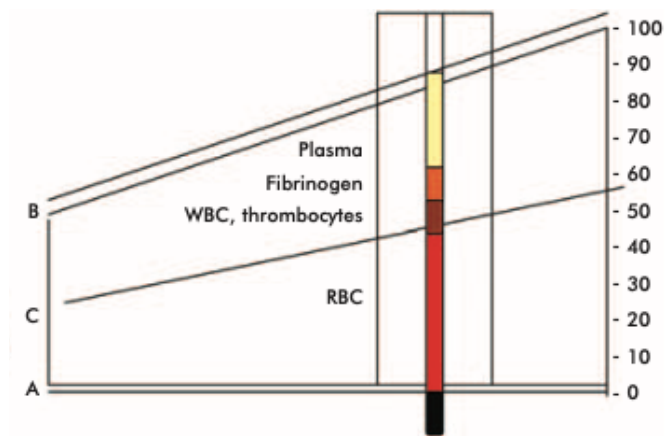


Figura 6: Lector del valor hematocrito de la muestra (Samour, 2005)

3.3.2. Proteínas totales

Las proteínas totales se obtuvieron tras centrifugar los capilares de hematocrito, y así se consiguieron por una parte los glóbulos rojos y por otra el plasma sanguíneo, siendo ésta la parte donde se encuentran las proteínas en el animal. Se utilizó un refractómetro (Clinical RS Hand Refractometer 3 Scales) previamente calibrado. A continuación, se pudo medir la cantidad de proteínas totales que presentaba la sangre del animal. Para medirlas, se rompió el capilar de hematocrito por la mitad y con leves toques se dejó caer una gota de plasma en el refractómetro. Se determinó el valor correspondiente de proteínas totales en g/dL tras observar en la fila del 0-12 donde cortaba la línea azul, como se puede ver en la Figura 7. Se realizó el mismo procedimiento para las demás muestras (Sakas & Bauck, 2002).



Figura 7: Ejemplo de medición de proteínas totales mediante refractómetro manual (Elaboración propia)

3.3.3. Determinación de la concentración de hemoglobina

La concentración de hemoglobina de las muestras por lotes se analizó con el uso de un hemoglobinómetro portátil representado en la Figura 8 (HemoCue Hb 201+ DM analyzer, HemoCue Inc, California USA). La muestra de sangre se introdujo en una cubeta por acción capilar. Este sistema obtuvo mediciones más sólidas de la hemoglobina y fue capaz de compensar los eritrocitos nucleados con el método de medición de doble longitud de espectrofotometría (570 nm a 880 nm) compensando turbidez (Velguth et al., 2010).



Figura 8: Partes del Hemoglobinómetro portátil HemoCue Hb 201+ DM analyzer: a) analizador, b) estación de acoplamiento y c) cubeta (Elaboración propia)

3.3.4. Recuento del total de glóbulos rojos

Para llevar a cabo el recuento total de glóbulos rojos se necesitó establecer una dilución de 1:200 con la tinción Natt y Herrick. Para realizarla se tomaron 10 μ L de sangre de la muestra y 1990 μ L de la tinción Natt y Herrick, que fueron homogeneizados en un tubo Eppendorf. Esta dilución fue esencial para distinguir mejor los eritrocitos y facilitar su contaje. De esa dilución homogeneizada se tomaron 10 μ L y se introdujeron en la cámara de Neubauer previamente humedecida para la colocación exacta de un cubreobjetos. La muestra se dejó reposar durante un periodo de 5 minutos para que la tinción sedimentara y se observaran correctamente las células (Campbell & Grant, 2022).

El recuento total de glóbulos rojos se llevó a cabo observando al microscopio óptico (Leica ICC50W) con el objetivo 40X y contando el número de eritrocitos contenidos en los 25 grupos de 16 cuadrados pequeños de la cámara (cuatro cuadrados de las esquinas y el cuadrado central) en el área

central de la cámara (áreas indicadas en la Figura 9) (Samour, 2005). Las células que fueron localizadas en los bordes de los cuadrados se contaron en el borde izquierdo y el borde superior siguiendo la regla de la “L”, omitiendo las que se encontraban en el borde derecho y el borde inferior para evitar la redundancia (Campbell & Grant, 2022). Los glóbulos rojos que se encontraron en estos cuadrados se sumaron y la fórmula que se empleó para obtener el número de eritrocitos por milímetros al cubo fue la siguiente:

$$\frac{N^{\circ} \text{ glóbulos rojos}}{\text{mm}^3} = \frac{N^{\circ} \text{ Total Glóbulos Rojos contados} \times \text{Factor diluido}}{\text{Volumen Total del Cuadrado}} = \frac{N^{\circ} \text{ Total GR contados} \times 200}{0,02}$$

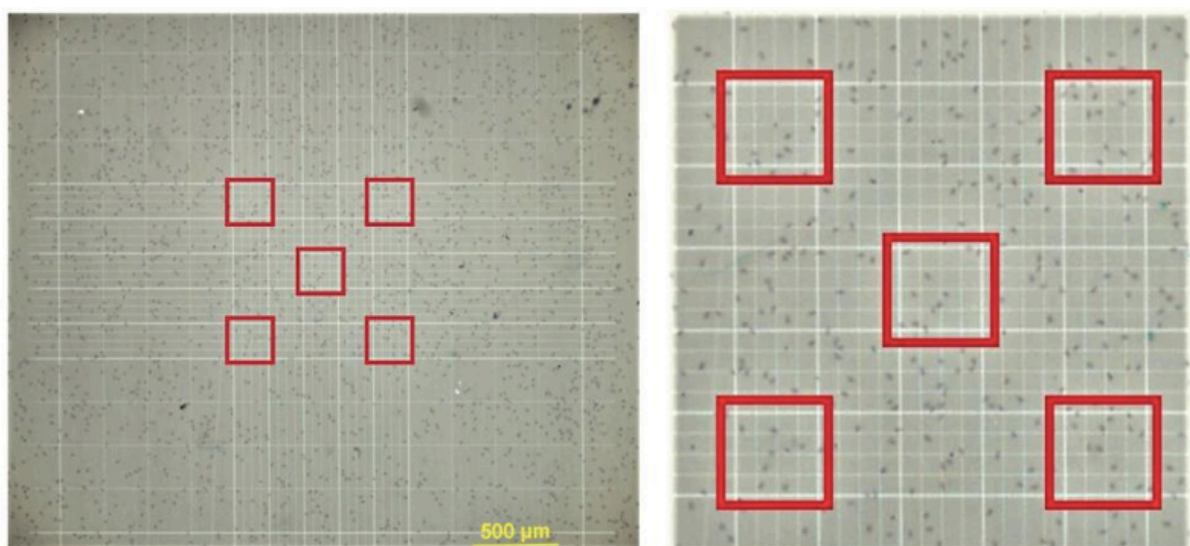


Figura 9: Recuento total de glóbulos rojos en la cámara de Neubauer. Las zonas cuadradas rojas indican dónde contar los glóbulos rojos (Campbell & Grant, 2022)

3.3.5. Recuento del total de glóbulos blancos

Para llevar a cabo el recuento total de glóbulos blancos se necesitó establecer una dilución de 1:200 con la tinción Natt y Herrick. Para realizarla se tomaron 10 μL de sangre de la muestra y 1990 μL de la tinción Natt y Herrick, que fueron homogeneizados en un tubo Eppendorf. Esta dilución fue esencial para distinguir mejor los glóbulos blancos y se tiñeron de azul oscuro para facilitar su conteo. De esa dilución homogeneizada se tomaron 10 μL y se introdujeron en la cámara de Neubauer, que aparece en la Figura 10, previamente humedecida para la colocación exacta de un cubreobjetos. La muestra se dejó reposar durante un periodo de 5 minutos para que la tinción reposara y penetrara correctamente en las células (Campbell & Grant, 2022).

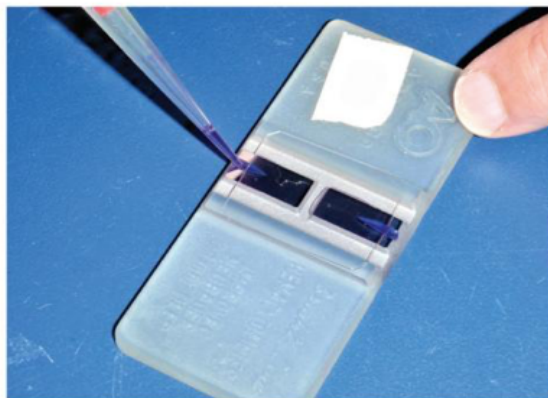


Figura 10: Colocación de los 10 μL de la muestra homogeneizada en la cámara de Neubauer (Campbell & Grant, 2022)

El recuento total de glóbulos blancos se llevó a cabo observando al microscopio óptico (Leica ICC50W) con el objetivo 40X y contando el número de células blancas de 16 cuadrados grandes en los cuatro cuadrados de las esquinas de la cámara (áreas indicadas en la Figura 11) (Samour, 2005). Las células que fueron localizadas en los bordes de los cuadrados se contaron en el borde izquierdo y el borde superior siguiendo la regla de la “L”, omitiendo las que se encontraban en el borde derecho y el borde inferior para evitar la redundancia (Campbell & Grant, 2022). Los glóbulos blancos que se encontraron en estos cuadrados se sumaron y la fórmula que se empleó para obtener el número de células blancas por milímetros al cubo fue la siguiente:

$$\frac{N^{\circ} \text{ glóbulos blancos}}{\text{mm}^3} = \frac{N^{\circ} \text{ Total Glóbulos Blancos contados} \times \text{Factor diluido}}{\text{Volumen Total del Cuadrado}} = \frac{N^{\circ} \text{ Total GB contados} \times 200}{0,4}$$

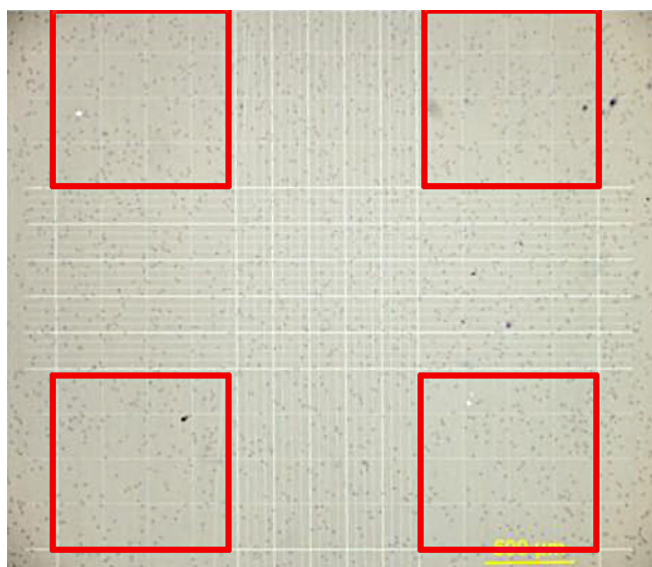


Figura 11: Recuento total de glóbulos blancos en la cámara de Neubauer. Las zonas cuadradas rojas indican dónde se realiza el recuento de los glóbulos blancos (Campbell & Grant, 2022)

3.3.6. Frotis sanguíneo y recuento diferencial de glóbulos blancos

Los frotis sanguíneos se prepararon con las muestras de sangre heparinizada en el transcurso de las 4 horas posteriores a su extracción. Principalmente se utilizaron para realizar el recuento diferencial de glóbulos blancos, observar artefactos, parásitos hemáticos y evaluación morfológica (Avni-Magen et al., 2016).

Para la realización de los frotis se empleó la técnica “slide-to-slide o push-slide” reproducida en la Figura 12. Se tomaron 5 microlitros de sangre de la muestra con micropipeta y se colocaron en el tercio final del portaobjetos. Se puso otro portaobjetos en el centro del anterior y se posicionó con un ángulo de unos 45°. Se retrocedió con el portaobjetos sin alterar el ángulo hasta entrar en contacto con la gota de sangre y se deslizó suavemente hacia delante extendiendo la sangre, dejando secar la muestra completamente antes de teñirla (Samour, 2005). Con este método se consiguió una distribución celular y campos de monocapa correctos favoreciendo su evaluación (Campbell & Grant, 2022).

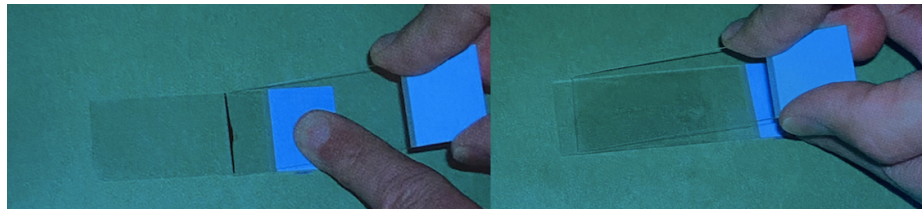


Figura 12: Frotis realizado mediante la técnica “slide-to-slide o push-slide” (Campbell & Grant, 2022)

El recuento diferencial de glóbulos blancos se llevó a cabo bajo aceite de inmersión en el aumento de máxima potencia (100X) en el microscopio óptico (Leica ICC50W) y en la zona de monocapa. En esta área se pudieron observar muy bien las células sanguíneas, ya que se encuentran en una monocapa facilitando su diferenciación. Se contaron manualmente y se clasificaron un total de 100 glóbulos blancos de acuerdo con las características morfológicas y de la tinción utilizada. El recuento diferencial de glóbulos blancos se expresó como un porcentaje del grupo celular (Samour, 2005).

3.3.6.1. Tinción Diff-Quick

La tinción Diff-Quick fue una de las tinciones utilizadas para teñir las muestras, siendo de las más utilizadas en veterinaria para teñir citologías y células sanguíneas en frotis. Gracias a esta tinción,

se observó con mayor exactitud los núcleos de las células sanguíneas, especialmente glóbulos blancos (Campbell & Grant, 2022).

Esta tinción constó de tres pasos (Campbell & Grant, 2022):

1. Fijación con metanol durante 10 segundos
2. Fijación con tinción eosinófila durante 10 segundos
3. Fijación con tinción basófila durante 10 segundos

Pasado el tiempo establecido, se enjuagó la muestra delicadamente con agua destilada y se dejó secar. Cuando la muestra estuvo completamente seca se observó al microscopio óptico (Leica ICC50W).

3.3.6.2. Tinción Wright

Para la preparación de la tinción de Wright se necesitó tener la tinción pura y el buffer. Para obtener la tinción pura se disolvió 0,1 g de la tinción en 60 mL de metanol. Se dejó reposar en un recipiente oscuro de 1 a 2 semanas antes de su empleo. Por otro lado, para obtener el buffer de Wright se necesitó disolver 3,80 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) y 5,47 g de fosfato dipotásico (KH_2PO_4) en 500 mL de agua destilada. Una vez disuelto, se consiguió con agua destilada que el volumen total fuera de 1000 mL (Campbell & Grant, 2022).

Una vez preparadas la tinción pura y el buffer de Wright tras el periodo de 1 a 2 semanas se pudieron teñir los frotis. Procedimiento de tinción de frotis con la tinción de Wright (Campbell & Grant, 2022):

1. Se colocó una fina capa de la tinción pura de Wright cubriendo todo el portaobjetos y esperamos de 1 a 3 minutos.
2. Pasados esos minutos se añadió el buffer de Wright de la misma manera dejando una fina capa del buffer cubriendo el portaobjetos. Se tuvo que soplar a la vez para homogeneizar el buffer con la tinción pura de Wright hasta que apareciera una capa verde metalizada en la superficie. Una vez apareció la capa verde metalizada se dejó reposar la muestra de 2 a 6 minutos.

3. Pasado el tiempo establecido, se enjuagó la muestra delicadamente con agua destilada y se dejó secar. Cuando la muestra estuvo completamente seca se observó al microscopio óptico (Leica ICC50W).

3.3.7. Medición de células sanguíneas

Las células sanguíneas se observaron al microscopio óptico (Leica ICC50W) y sus mediciones se realizaron con el programa LAS EZ Leica Application Suite Versión 3.3.0. Se midieron 50 células de cada tipo (Campbell & Grant, 2022):

- Trombocitos
- Serie roja: Eritrocitos
- Serie blanca: Leucocitos aviares, incluyendo granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y células mononucleares (linfocitos y monocitos)

3.3.8. Determinación de índices eritrocitarios

Los índices eritrocitarios evaluados fueron el volumen corpuscular medio en femtolitros, la hemoglobina corpuscular media en picogramos y la concentración de hemoglobina corpuscular media en g/dL. Se determinaron de forma indirecta (fórmulas expuestas en la Tabla 2), utilizando los resultados de las muestras del hematocrito, el recuento total de glóbulos rojos y de la hemoglobina (Campbell & Grant, 2022).

Tabla 2: Fórmulas empleadas para la obtención de los índices eritrocitarios (Adaptado de Campbell & Grant, 2022)

Índices Eritrocitarios	Fórmulas
VCM	$\frac{\text{Valor hematocrito} \times 10}{\text{Recuento total de glóbulos rojos}}$
HbCM	$\frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Recuento total de glóbulos rojos}}$
CHCM	$\frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Valor hematocrito}}$

VCM: Volumen corpuscular medio, HbCM: Hemoglobina corpuscular media y CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media

3.4. REGISTRO DE DATOS

Los datos obtenidos en el estudio se registraron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel Workbook para su posterior análisis.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo de los parámetros hematológicos analizados en el estudio y se calculó la media, mediana, desviación estándar e intervalos de confianza del 95% para la media indicando límites inferiores y superiores para cada categoría hematológica. Se detectaron y eliminaron valores atípicos utilizando diagramas de cajas y bigotes. La distribución de los datos se determinó visualizando los histogramas de cada parámetro y corroborándolo con el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Los resultados obtenidos en las poblaciones celulares con las diferentes tinciones se compararon utilizando la prueba T de Student ($p > 0,05$) para muestras pareadas en aquellos datos que siguieron una distribución Gaussiana. Por otro lado, los que no siguieron una distribución Gaussiana fueron comparados mediante el test de Friedman ($p > 0,05$). Ambos test compararon las medias de dos muestras emparejadas. Todos los datos analizados se llevaron a cabo mediante el programa IBM® SPSS® Statistics versión 27.

4. RESULTADOS

Se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena yugular derecha de 35 ejemplares de cerceta pardilla aparentemente sanos en el momento de la extracción, anillados y liberados posteriormente. Todos los animales analizados fueron individuos juveniles de sexo indeterminado.

Las muestras sanguíneas que se obtuvieron, se distribuyeron en dos tubos con dos tipos de anticoagulantes (heparina y EDTA) para determinar cuál de ellos funcionaba mejor para la especie aviar estudiada. Con EDTA las muestras se lisaron y se coagularon impidiendo la correcta realización de las pruebas, mientras que con el uso de heparina las muestras se observaron correctamente y permanecieron viables en el interior del tubo durante todo el periodo de análisis. Al observar lo que ocurría en las muestras, las extracciones pasaron a ser recolectadas únicamente en tubos heparinizados.

4.1. RESULTADOS DE LA SERIE ROJA

4.1.1. Parámetros hematológicos

Tras la eliminación de los valores atípicos, se generaron valores de referencia dentro de la serie roja para: valor hematocrito, recuento total de glóbulos rojos, hemoglobina e índices eritrocitarios (VCM, HbCM, CHCM). Estos datos se muestran en la Tabla 3 junto con las unidades indicadas por el sistema internacional, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 3: Resultados serie roja

Parámetro	Unidades SI	n	Medias	SD	Medianas	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite Inferior	Límite superior
Hto	%	35	52,0	± 3,2	51,0	50,8	53,2
RBC	x 10 ⁶ céls/ μ L	35	3,1	± 0,9	3,1	2,8	3,5
Hb	g/dL	31	17,7	± 1,3	18,2	17,2	18,2
VCM	fL	33	169,8	± 44,0	162,8	153,0	186,5
HbCM	pg	34	58,6	± 15,1	54,9	52,9	64,4
CHCM	g/dL	34	34,6	± 1,9	35,3	33,9	35,3

Hto: Valor hematocrito, RBC: Recuento total de glóbulos rojos, Hb: Hemoglobina, VCM: Volumen corpuscular medio, HbCM: Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, n: Tamaño muestral empleado y SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

Cabe destacar que para la determinación de la hemoglobina mediante el hemoglobímetro portátil, el resultado tardó en aparecer de 15 segundos a 1 minuto dependiendo de la concentración de hemoglobina que tuviera la muestra.

4.1.2. Morfología eritrocitaria en frotis sanguíneo

En cuanto a la morfología de los eritrocitos, se observaron en mayor medida eritrocitos maduros no policromatófilos, en menor medida se apreciaron eritrocitos inmaduros policromatófilos y ocasionalmente se vieron reticulocitos en todas las aves estudiadas, como se puede apreciar en la Figura 13. Además, se registraron los efectos que tuvieron las tinciones en los eritrocitos como vemos en la Tabla 4.

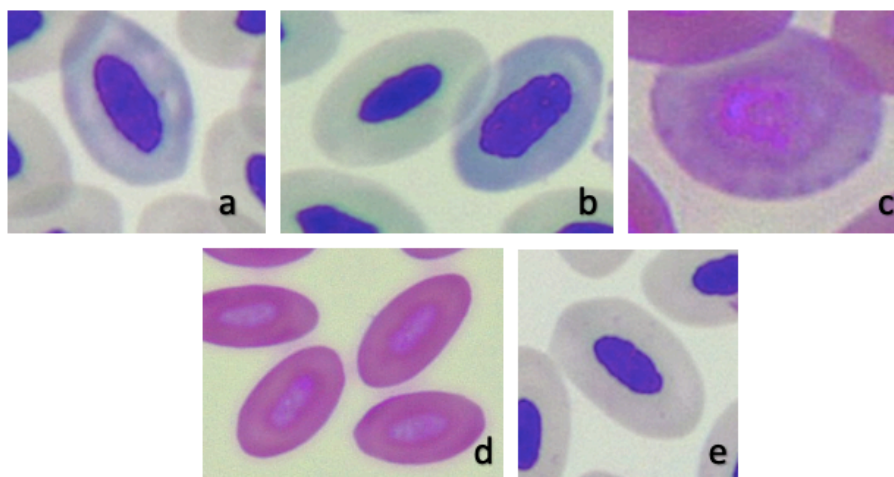


Figura 13: Morfología eritrocitaria en frotis sanguíneo. Las letras indicadas corresponden a: a) eritrocito policromatófilo inmaduro mostrando la intensa coloración azulada en el citoplasma en la tinción Diff-Quick, b) eritrocito maduro junto a un eritrocito inmaduro policromatófilo en tinción Diff-Quick, c) célula con material reticular punteado llamada reticulocito, d) eritrocitos maduros no policromatófilos en tinción Wright y e) eritrocito no policromatófilo en tinción Diff-Quick (Elaboración propia)

Tabla 4: Coloración de eritrocitos según tinción (Elaboración propia)

Tinción	Efecto de la tinción en la célula
Eritrocito en tinción Wright	Núcleo basófilo tenue y citoplasma color eosinófilo intenso
Eritrocito en tinción Diff-Quick	Núcleo color basófilo oscuro y citoplasma color grisáceo claro

También se observó cierto grado de anisocitosis y anisocariosis en las muestras de todas las cercetas pardillas. Por el contrario, no se observaron parásitos hemáticos ni signos de toxicidad celular en ninguna muestra analizada.

4.1.3. Medición de eritrocitos

Se midieron 50 eritrocitos en micras (ancho y largo) para determinar su tamaño medio. Las mediciones se ven representadas en la Tabla 5 junto con la zona de medición, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 5: Mediciones eritrocitarias

Parámetro	Zona de Medición	n	Medias (μm)	SD	Medianas (μm)	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite Inferior (μm)	Límite superior (μm)
Eritrocitos	Ancho	50	6,8	± 0,5	6,8	6,7	7,0
	Largo	50	12,2	± 0,4	12,1	12,1	12,3

n: Tamaño muestral empleado y SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

4.2. RESULTADOS DE LA SERIE BLANCA

4.2.1. Recuento total de glóbulos blancos

Se generaron valores de referencia dentro de la serie blanca para el recuento total de glóbulos blancos. Los resultados se interpretan en la Tabla 6 junto a las unidades indicadas por el sistema internacional, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 6: Recuento total de glóbulos blancos

Parámetro	Unidades SI	n	Medias	SD	Medianas	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite Inferior	Límite superior
WBC	x 10 ³ céls/μL	35	4,9	± 1,6	4,5	4,3	5,5

WBC: Recuento total de glóbulos blancos, n: Tamaño muestral empleado y SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

4.2.2. Morfología leucocitaria en frotis sanguíneo y diferencial de glóbulos blancos

La identificación de células sanguíneas se realizó al mismo tiempo que el recuento diferencial de glóbulos blancos y se pudieron ir tomando fotografías de las células. Esto se consideró importantísimo para poder crear bases de datos con imágenes de cada una de las células blancas

presentes en esta ave para futuros estudios. Se generaron bases de datos de imágenes en cada una de las tinciones empleadas y dichas imágenes se pudieron utilizar posteriormente para realizar mediciones anecdóticas de las células. El recuento diferencial de glóbulos blancos se llevó a cabo en dos tinciones: tinción Wright y tinción Diff-Quick. Los linfocitos fueron los leucocitos más abundantes en las muestras seguidos por los heterófilos.

4.2.2.1. Tinción Wright

Se generaron valores de referencia dentro de la serie blanca para el recuento diferencial de glóbulos blancos en esta tinción. Los resultados se interpretan en la Tabla 7 junto a las unidades indicadas por el sistema internacional, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 7: Recuento diferencial de glóbulos blancos en tinción Wright

Parámetro Tinción W	n	Medias	SD	Medianas	Intervalo de Confianza 95%	
					Límite Inferior	Límite superior
EOS (%)	33	3,3	± 1,3	3,0	2,8	3,7
HET (%)	34	16,0	± 2,9	15,0	15,0	17,1
BAS (%)	35	1,1	± 1,2	1,0	0,7	1,5
LINF (%)	33	78,0	± 2,7	78,0	77,1	79,0
MON (%)	35	1,2	± 0,6	1,0	1,0	1,4

W: Tinción Wright, EOS: Eosinófilos, HET: Heterófilos, BAS: Basófilos, LINF: Linfocitos, MON: Monocitos, n: Tamaño muestral empleado y SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

Esta tinción tiñó correctamente las células blancas. Sin embargo, los gránulos de los eosinófilos y heterófilos se tiñeron con mayor definición y sus núcleos de forma más tenue. La forma en la que se tiñó cada célula se registró y se creó la Tabla 8 con la información recopilada. En la Figura 14 se aprecia la gran variedad de células blancas presentes en la sangre de la cerceta pardilla.

Tabla 8: Forma en la que se tiñó cada célula con tinción Wright (Elaboración propia)

Tipo de célula	Efecto de la tinción en la célula
Eosinófilo	Gránulos basófilo-eosinófilos
Heterófilo	Gránulos basófilos tenues
Basófilo	Gránulos basófilos oscuros
Linfocito	Núcleo basófilo tenue y citoplasma azul claro
Monocito	Núcleo basófilo tenue y citoplasma azul claro

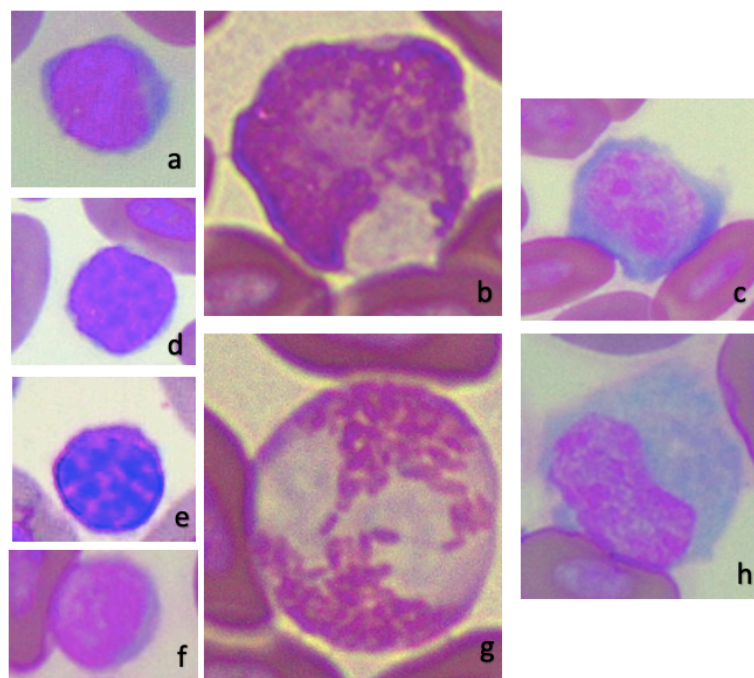


Figura 14: Identificación de células blancas en tinción Wright. Las células observadas son: a) linfocito, b) eosinófilo, c) monocito, d) basófilo, e) basófilo, f) linfocito, g) heterófilo y h) monocito (Elaboración propia)

4.2.2.2. Tinción Diff-Quick

Se generaron valores de referencia dentro de la serie blanca para el recuento diferencial de glóbulos blancos en esta tinción. Los resultados se interpretan en la Tabla 9 junto a las unidades indicadas por el sistema internacional, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 9: Recuento diferencial de glóbulos blancos con tinción Diff-Quick

Parámetro Tinción DQ	n	Medias	SD	Medianas	Intervalo de Confianza 95%	
					Límite Inferior	Límite superior
EOS (%)	28	2,4	± 0,8	2,0	2,1	2,7
HET (%)	34	16,5	± 2,9	16,5	15,5	17,5
BAS (%)	35	1,1	± 1,2	1,0	0,7	1,5
LINF (%)	33	77,9	± 2,4	78,0	77,0	78,7
MON (%)	35	1,3	± 0,7	1,0	1,0	1,5

DQ: Tinción Diff-Quick, EOS: Eosinófilos, HET: Heterófilos, BAS: Basófilos, LINF: Linfocitos, MON: Monocitos, n: Tamaño muestral empleado, SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

Esta tinción tiñó correctamente las células blancas. Sin embargo, los gránulos de los eosinófilos y heterófilos se tiñeron de forma más tenue y sus núcleos y citoplasmas con mayor definición. La forma en la que se tiñó cada célula se registró y se creó la Tabla 10 indicada a continuación con la información recopilada y en la Figura 15 se aprecia la gran variedad de células blancas presentes en la sangre de la cerceta pardilla.

Tabla 10: Forma en la que se tiñó cada célula blanca con tinción Diff-Quick (Elaboración propia)

Tipo de célula	Efecto de la tinción en la célula
Eosinófilo	Núcleo basófilo oscuro y gránulos azul basófilo
Heterófilo	Núcleo basófilo y gránulos basófilos tenues
Basófilo	Gránulos color basófilo oscuro
Linfocito	Núcleo basófilo y citoplasma azul basófilo tenue
Monocito	Núcleo basófilo y citoplasma azul basófilo tenue

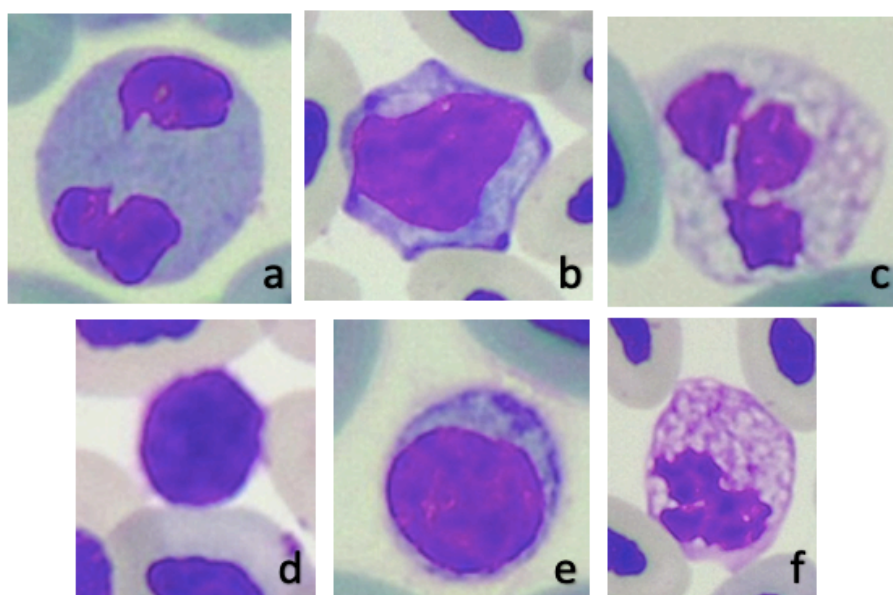


Figura 15: Identificación de células blancas en tinción Diff-Quick. Las células observadas son: a) eosinófilo, b) monocito, c) heterófilo, d) basófilo, e) linfocito y f) heterófilo (Elaboración propia)

Se demostró que no habían diferencias significativas en el recuento diferencial de glóbulos blancos mediante tinción Diff-Quick y tinción Wright. Los resultados obtenidos para cada leucocito según la prueba Friedman y T de Student fueron:

- Eosinófilos: No hay diferencias entre tinciones (prueba Friedman para muestras emparejadas, $p > 0,05$)

- Basófilos: No hay diferencias entre tinciones (prueba Friedman para muestras emparejadas, $p > 0,05$)
- Monocitos: No hay diferencias entre tinciones (prueba Friedman para muestras emparejadas, $p > 0,05$)
- Heterófilos: No hay diferencias entre tinciones (prueba T de Student para muestras pareadas, $p > 0,05$)
- Linfocitos: No hay diferencias entre tinciones (prueba T de Student para muestras pareadas, $p > 0,05$)

Mediante los histogramas se observó si la distribución era normal o no y en los diagramas de cajas y bigotes se observaron los parámetros y se evaluaron las diferencias. En el Anexo I se pueden apreciar los diagramas de cajas y bigotes de los leucocitos en ambas tinciones.

4.2.3. Medición de leucocitos

Se midieron 50 células blancas de cada tipo en micras (ancho y largo) para determinar su tamaño medio. Las mediciones se ven representadas en la Tabla 11 junto con la zona de medición, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 11: Medición de leucocitos

Parámetro	Zona de Medición	n	Medias (μm)	SD	Medianas (μm)	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite Inferior (μm)	Límite superior (μm)
Eosinófilos	Ancho	50	11,1	$\pm 1,4$	11,1	10,7	11,5
	Largo	50	11,3	$\pm 1,4$	11,4	10,9	11,7
Heterófilos	Ancho	50	11,0	$\pm 1,2$	11,2	10,6	11,3
	Largo	50	10,8	$\pm 1,2$	11,1	10,5	11,2
Basófilos	Ancho	50	5,9	$\pm 0,8$	5,8	5,7	6,1
	Largo	50	6,1	$\pm 0,6$	6,1	6,0	6,3
Linfocitos	Ancho	50	6,8	$\pm 0,9$	6,6	6,5	7,1
	Largo	50	6,6	$\pm 0,9$	6,4	6,3	6,8
Monocitos	Ancho	50	9,3	$\pm 1,2$	9,5	8,9	9,6
	Largo	50	9,9	$\pm 1,2$	9,7	9,5	10,2

n: Tamaño muestral empleado y SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

Se capturaron imágenes de algunas mediciones realizadas en micras para mostrar la precisión de las mismas en distintas células como podemos percibir en la Figura 16.

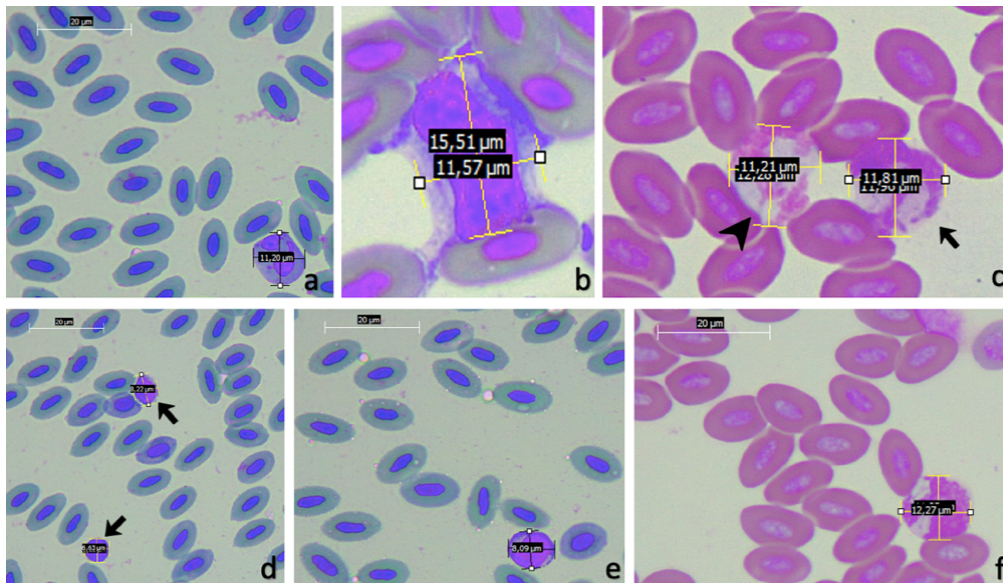


Figura 16: Ejemplo de mediciones realizadas en células blancas. Se representan en la figura como: a) eosinófilo en tinción Diff-Quick, b) monocito en tinción Diff-Quick, c) eosinófilo señalado con la flecha negra y heterófilo señalado con punta de flecha negra en tinción Wright, d) linfocitos señalados con flechas negras en tinción Diff-Quick, e) monocito en tinción Diff-Quick y f) heterófilo en tinción Wright (Elaboración propia)

4.3. RESULTADOS DE TROMBOCITOS

Se observaron aglomeraciones de trombocitos en frotis sanguíneos lo que imposibilitó el propio recuento. En la Figura 17 se muestra cómo se observaron los trombocitos en tinción Diff-Quick y en tinción Wright y en la Tabla 12 se muestra la forma en la que los trombocitos se tiñeron según la tinción empleada.

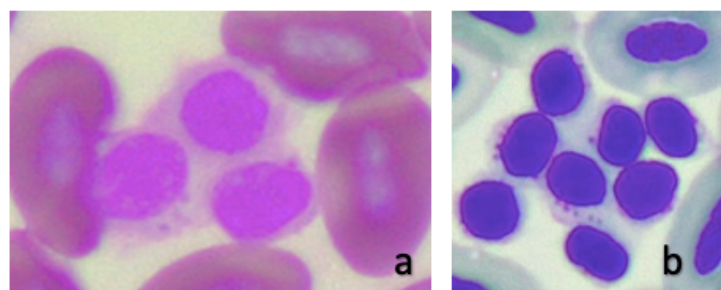


Figura 17: Trombocitos en frotis sanguíneo. Se representan en la figura como: a) trombocitos en tinción Wright y b) trombocitos en tinción Diff-Quick (Elaboración propia)

Tabla 12: Forma en la que se tiñeron los trombocitos según la tinción (Elaboración propia)

Tipo de célula	Efecto de la tinción en la célula
Trombocito en tinción Wright	Núcleo basófilo tenue y citoplasma incoloro o eosinófilo tenue
Trombocito en tinción Diff-Quick	Núcleo basófilo oscuro y citoplasma incoloro o azul tenue

Se midieron 50 trombocitos en micras (ancho y largo) para determinar su tamaño medio. Las mediciones se reflejan en la Tabla 13 junto con la zona de medición, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 13: Mediciones de trombocitos

Parámetro	Zona de Medición	n	Medias (μm)	SD	Medianas (μm)	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite Inferior (μm)	Límite superior (μm)
Trombocitos	Ancho	50	4,3	$\pm 0,5$	4,3	4,1	4,4
	Largo	50	3,9	$\pm 0,4$	3,9	3,8	4,0

n: Tamaño muestral empleado y SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

4.4. RESULTADOS DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE REFRACTOMETRÍA

Se generaron valores de referencia para proteínas totales mediante refractómetro manual a partir del plasma de la muestra. Los valores de referencia de proteínas totales obtenidos para la cerceta pardilla aparecen en la Tabla 14 junto con las unidades indicadas por el sistema internacional, el tamaño muestral empleado para su determinación, media y mediana correspondiente, desviación estándar e intervalo de confianza del 95% para la media indicando límite inferior y superior.

Tabla 14: Valores obtenidos para proteínas totales

Parámetro	Unidades SI	n	Medias	SD	Medianas	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite Inferior	Límite superior
PT	g/dL	30	6,1	$\pm 0,2$	6,2	6,1	6,2

PT: Proteínas totales, SI: Sistema Internacional, SD: Desviación estándar (Elaboración propia)

5. DISCUSIÓN

Según Sánchez-Torres et al. (2021) las variables hematológicas son elementos básicos para evaluar la salud general de las aves, conocer los parámetros por especie y diagnosticar desequilibrios en sus poblaciones celulares. Por ello cada vez hay más estudios implantados en distintas especies aviares, pero aun así siguen siendo escasos, sobre todo para especies pertenecientes a la fauna silvestre.

Meoño-Sánchez et al. (2016) destacan que no hay diferencias entre los valores de distintos sexos concordando así con lo reportado para otras especies de anátidas como el ganso nival (*Chen caerulescens*) y el ganso canadiense (*Branta canadensis*). Así mismo, Books et al. (2022) apoyan que no hay diferencias significativas en los valores hematológicos entre sexos en anseriformes, indicando la posibilidad de llevar a cabo estudios válidos sin diferenciación entre sexos.

Campbell & Grant (2022) corroboran que el EDTA es el anticoagulante más usado, pero para determinados grupos aviares, como por ejemplo patos, puede desencadenar hemólisis parcial tras la extracción cuando se recolecta en tubos de EDTA, lo que hace que la muestra de sangre no sea apta para estudios hematológicos.

Según Friedrichs et al. (2012) se pueden establecer valores de referencia para cualquier especie con muestras > 20 y < 40 siempre y cuando se calculen con métodos paramétricos para establecer la normalidad de las muestras o con métodos robustos (independientes de la distribución) y además se realicen intervalos de confianza para la media de al menos un 90%, histogramas, medias, medianas y valores máximos y mínimos, como los realizados en este estudio.

5.1. PARÁMETROS SERIE ROJA

5.1.1. Valor hematocrito (Hto)

Tras realizar la técnica del microhematocrito, el porcentaje de la sangre del animal que corresponde a células sanguíneas tiene un promedio de $52 \pm 3,2\%$ y el intervalo de referencia con un 95% de confianza se encuentra entre 50,8 y 53,2%. Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de referencia estipulado para el porrón pardo (*Aythya nyroca*) (Avni-Magen et al., 2016), la barnacla canadiense (*Branta canadensis*) (Campbell & Grant, 2022) y el ánade real (*Anas*

platyrhynchos) (Campbell & Grant, 2022). Sin embargo, presenta a su vez valores mucho más elevados que el pato joyuyo (*Aix sponsa*) siendo de $46 \pm 3\%$ (Carpenter, 2018), el pijije común (*Dendrocygna autumnalis*) con un intervalo de 33-42% (Meoño-Sánchez et al., 2016) y el ganso común (*Anser anser*) con un promedio de $44,7 \pm 3,1\%$ (Jahantigh & Zamani-Ahmadmahmudi, 2016).

5.1.2. Recuento total de glóbulos rojos (RBC)

Tras realizar el recuento en la cámara de Neubauer, el promedio obtenido para el recuento total de glóbulos rojos es de $3,1 \pm 0,9$ ($\times 10^6$ céls/ μL) y el intervalo de referencia obtenido es de 2,8 a 3,5 ($\times 10^6$ céls/ μL) que concuerda con los establecidos en otros estudios realizados dentro de la familia de las anátidas, como por ejemplo los realizados en las siguientes especies: el ganso común (Jahantigh & Zamani-Ahmadmahmudi, 2016), la barnacla canadiense, el ánade real (Campbell & Grant, 2022) y el pato joyuyo (Carpenter, 2018).

5.1.3. Hemoglobina (Hb)

Según Velguth et al. (2010) el uso de hemoglobinómetros portátiles debería estar más en auge, ya que compensan los eritrocitos nucleados mediante espectrofotometría de doble longitud de onda. De esta forma, se convierte en una herramienta fundamental para categorizar anemias y obtener resultados rápidos a partir de pequeños volúmenes en aves.

Además, Gustavsson (2015) comenta que la obtención de los valores de hemoglobina aviáres procedentes de muestras con un volumen muy pequeño es posible gracias a este método, conservando más muestra para las demás técnicas empleadas y obteniendo información útil en poco tiempo facilitando la caracterización de anemias en estos animales.

El valor de hemoglobina obtenido para esta especie tiene un promedio de $17,7 \pm 1,3$ g/dL con un intervalo de referencia de 17,2 a 18,2 g/dL. Comparándose con estudios previos dentro de la familia de las anátidas, resaltar que se encuentra dentro del rango establecido para la barnacla canadiense y para el ánade real (Campbell & Grant, 2022). Aun así, presenta valores más elevados que los del ganso común siendo de $14,55 \pm 1,10$ g/dL (Jahantigh & Zamani-Ahmadmahmudi, 2016) y los del pato joyuyo con un promedio de 15 ± 1 g/dL (Carpenter, 2018).

5.1.4. Índices eritrocitarios

En general, los índices eritrocitarios generados para la cerceta pardilla demuestran que los eritrocitos son relativamente grandes como en otras anátidas y que difieren con otras especies de la misma familia al situarse con valores inferiores de hemoglobina.

5.1.4.1. Volumen corpuscular medio (VCM)

El promedio obtenido para el volumen corpuscular medio en cercetas pardillas juveniles es de $169,8 \pm 44$ fL con un intervalo de 153-186,5 fL. Estos resultados ratifican los obtenidos para otras especies dentro de la misma familia, como por ejemplo: la barnacla canadiense (Carpenter, 2018), el ánade real (Campbell & Grant, 2022), el pato joyuyo (Carpenter, 2018) y finalmente, el pijije común (Meoño-Sánchez et al., 2016).

5.1.4.2. Hemoglobina corpuscular media (HbCM)

La hemoglobina corpuscular media obtenida para la cerceta pardilla tiene un valor promedio de $58,6 \pm 15,1$ pg dentro de un intervalo de 52,9-64,4 pg. Este valor se encuentra dentro del rango establecido por Carpenter (2018) para la barnacla canadiense.

5.1.4.3. Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM)

La concentración de hemoglobina corpuscular media establecida para la cerceta pardilla tiene un promedio de $34,6 \pm 1,9$ g/dL dentro del intervalo de 33,9 y 35,3 g/dL. Presenta valores ligeramente más elevados que otras tres especies estudiadas previamente: la barnacla canadiense (Carpenter, 2018), el ánade real (Campbell & Grant, 2022) y el pijije común (Meoño-Sánchez et al., 2016). Por el contrario, comparte un promedio similar para CHCM con el pato joyuyo (Carpenter, 2018) siendo de 33 ± 4 g/dL.

5.2. PARÁMETROS SERIE BLANCA

5.2.1. Recuento total de glóbulos blancos (WBC)

Según Campbell (1994) el recuento de glóbulos blancos en aves ha de realizarse de forma manual al tener la particular característica de poseer eritrocitos y trombocitos nucleados. Si se usaran

contadores celulares electrónicos no se distinguirían los glóbulos blancos de los trombocitos ni de los glóbulos rojos aportando datos erróneos.

Mediante el uso de la cámara de Neubauer se ha obtenido un promedio de $4,9 \pm 1,6$ ($\times 10^3$ céls/ μ L) y un intervalo de 4,3-5,5 ($\times 10^3$ céls/ μ L) para el recuento total de glóbulos blancos. Por un lado, este promedio entra dentro del establecido para el porrón pardo (Avni-Magen et al., 2016) y para el pijije común (Meoño-Sánchez et al., 2016), pero por otro lado, es cinco veces inferior al establecido en especies anátidas como el pato joyuyo (Carpenter, 2018), la barnacla canadiense y el ánade real (Campbell & Grant, 2022).

5.2.2. Diferencial de glóbulos blancos

Sánchez-Torres et al. (2021) comentan que la dieta, las condiciones higiénicas, el desarrollo del plumaje y el color pueden influir levemente en los parámetros hematológicos obtenidos. A través del diferencial de glóbulos blancos se consiguen distinguir de forma más precisa los tipos de leucocitos en la sangre.

Se emplean dos tinciones en este estudio: la tinción Wright y la tinción Diff-Quick para determinar con qué tinción se pueden valorar mejor las células para la cerceta pardilla. Gracias a la estadística empleada en el estudio se puede determinar que no hay diferencias significativas de una tinción a otra, siendo muy interesante para futuras verificaciones y estudios. Los promedios obtenidos para cada tipo de célula blanca y los intervalos establecidos en la cerceta pardilla se han contrastado con 5 especies dentro de la familia de las anátidas: el porrón pardo, el ganso común, el pijije común, la barnacla canadiense y el ánade real.

5.2.2.1. Eosinófilos

El promedio de eosinófilos en ambas tinciones es de $2,4 \pm 0,8\%$ en tinción Diff-Quick y de $3,3 \pm 1,3\%$ en tinción Wright, encontrándose dentro de los valores promedios establecidos para: el porrón pardo (Avni-Magen et al., 2016), el pijije común (Meoño-Sánchez et al., 2016) y la barnacla canadiense (Carpenter, 2018). En cambio, especies como el ganso común (Jahantigh & Zamani-Ahmadmhamudi, 2016) y el ánade real (Campbell & Grant, 2022) presentan valores muy inferiores, entorno al 1%.

5.2.2.2. Basófilos

El intervalo y promedio determinado para la cerceta pardilla se asemeja a los realizados en otras especies de la misma familia, siendo éste exactamente igual en ambas tinciones. El promedio es de $1,1 \pm 1,2\%$ y el intervalo de $0,7-1,5\%$. Las especies que poseen datos semejantes a este estudio son: el porrón pardo (Avni-Magen et al., 2016), el ganso común (Jahantigh & Zamani-Ahmadmahmudi, 2016), el pijije común (Meoño-Sánchez et al., 2016) y el ánade real (Campbell & Grant, 2022). Por el contrario, la especie que difiere de estos valores es la barnacla canadiense (Carpenter, 2018) situándose en valores de hasta 7%.

5.2.2.3. Heterófilos y linfocitos

Por un lado, el promedio de heterófilos para ambas tinciones varía 0,5%. En la tinción Diff-Quick el promedio es de $16,5 \pm 2,9\%$, mientras que en la tinción Wright es de $16,0 \pm 2,9\%$. Por otro lado, el promedio de linfocitos para ambas tinciones es prácticamente igual, siendo en la tinción Diff-Quick de $77,9 \pm 2,4\%$ y en la tinción Wright de $78,0 \pm 2,7\%$. Los linfocitos son los leucocitos más abundantes en la cerceta pardilla seguidos de los heterófilos. Especies como el ganso común (Jahantigh & Zamani-Ahmadmahmudi, 2016) y el ánade real (Campbell & Grant, 2022) presentan también promedios de más de un 50% de linfocitos evidenciando que son más prevalentes que los heterófilos. Sin embargo, especies como el pijije común (Meoño-Sánchez et al., 2016), la barnacla canadiense (Carpenter, 2018) y el porrón pardo (Avni-Magen et al., 2016) muestran una tendencia contraria, siendo los heterófilos más predominantes que los linfocitos en la sangre.

5.2.2.4. Monocitos

Por último, el promedio de los monocitos es de $1,3 \pm 0,7\%$ en tinción Diff-Quick y $1,2 \pm 0,6\%$ en tinción Wright. Se asemeja a los establecidos para especies como el porrón pardo (Avni-Magen et al., 2016), el ganso común (Jahantigh & Zamani-Ahmadmahmudi, 2016), el pijije común (Meoño-Sánchez et al., 2016) y el ánade real (Campbell & Grant, 2022). Y difiere de nuevo con la barnacla canadiense que tiene un valor más elevado de hasta un 6% (Carpenter, 2018).

5.3. IDENTIFICACIÓN CELULAR

Clark et al. (2009) atestiguan que las tinciones celulares permiten la observación de las células sanguíneas con mayor detalle evitando fallos en el recuento diferencial. Así mismo, destacan la importancia de teñir correctamente los frotis sanguíneos según el protocolo establecido. Si no se sigue el protocolo la identificación celular será errónea, ya que las muestras no se teñirán correctamente o por el contrario se sobre teñirán. También afianzan el uso de la tinción de Wright y la tinción Diff-Quick como tinciones igualmente correctas para llevar a cabo el recuento diferencial en anátidas. Además, Campbell & Grant (2022) corroboran que la tinción de Wright tiñe mejor los gránulos y la tinción Diff-Quick tiñe mejor los núcleos, pero permiten llevar a cabo el recuento diferencial igual de preciso.

Por otro lado, Campbell & Grant (2022) confirman que existen variaciones en la morfología eritrocitaria en frotis de aves sanas al igual que en aves con problemas de salud. Brooks et al. (2022) recalcan que las anseriformes presentan habitualmente niveles leves de anisocitosis y anisocariosis.

5.4. MEDICIONES DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

La unidad de medición empleada en este estudio para eritrocitos, trombocitos, eosinófilos, heterófilos, basófilos, linfocitos y monocitos es la micra. Según Brooks et al. (2022) los eosinófilos y los heterófilos suelen tener un tamaño similar en las anátidas, lo que concuerda con las mediciones obtenidas, siendo los eosinófilos $11,1 \pm 1,4 \times 11,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$ y los heterófilos $11,0 \pm 1,2 \times 10,8 \pm 1,2 \mu\text{m}$. También coinciden en el diámetro medio de estas células que es de $10 \mu\text{m}$ y en el ancho de los monocitos que es de $9,5 \mu\text{m}$. Recalcan que los eritrocitos presentan tamaños entre $12-14 \mu\text{m}$ de largo y $6-8 \mu\text{m}$ de ancho coincidiendo plenamente con los obtenidos en este estudio y también establecen que el ancho de trombocitos en anátidas es de $4,5-6 \mu\text{m}$ y el de los basófilos de $6,4 \mu\text{m}$, todos ellos dentro del rango determinado en el estudio para cercetas pardillas.

5.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE REFRACTOMETRÍA

Según Cray et al. (2008) en aves no está claro el uso de la refractometría para obtener valores de proteínas totales, ya que según la especie puede ser válida o no. Pero también comentan que en patos se ha visto que la concentración media de proteínas totales tanto en plasma como en suero

medida mediante refractometría difiere únicamente un 1% del método de Biuret, por lo que los valores obtenidos en este estudio para la cerceta pardilla serían clínicamente válidos.

Andreasen et al. (1989) corroboran que los valores obtenidos mediante refractometría a partir de suero o plasma en patos son comparables a los obtenidos mediante el método de Biuret. Además, recalcan que el uso de refractómetros es muy útil en la práctica clínica y gracias a ellos se determinan las proteínas totales a partir del plasma de capilares de hematocrito previamente centrifugados.

En este estudio el intervalo de referencia obtenido para proteínas totales es de 6,1 – 6,2 g/dL con un valor promedio de $6,1 \pm 0,2$ g/dL. Estos resultados son ligeramente más elevados al compararse con el estudio establecido por Jahantigh & Zamani-Ahmadmahmudi (2016) para el ganso común con un promedio de $4,36 \pm 0,7$ g/dL o con el establecido por Carpenter (2018) para la barnacla canadiense con promedios de $4,8 \pm 0,7$ g/dL.

Los ejemplares juveniles de cerceta pardilla de este estudio se encontraban todos aparentemente sanos en el momento de la extracción, además de ser sometidos a controles puntuales al pertenecer al programa “LIFE Cerceta pardilla” persiguiendo la conservación de esta especie amenazada y la reintroducción en su hábitat natural. Debido al control proporcionado para estos ejemplares dentro del programa de cría, los parámetros hematológicos estudiados que difieran a los establecidos en ciertas especies dentro de la familia de las anátidas con las que se ha comparado, sugieren que pueden ser normales para la cerceta pardilla.

Se han definido correctamente los parámetros de referencia propuestos aun siendo conscientes de las limitaciones de este estudio que radican en el número de ejemplares (deseando conseguir mayor número de muestras en un futuro y poder verificar los datos obtenidos) y en la falta de presupuesto para llevar a cabo más pruebas hematológicas, como la bioquímica completa que conseguiría dar mayor utilidad al estudio.

6. CONCLUSIONES

1. Se han establecido valores de referencia del hemograma y las proteínas totales plasmáticas para las cercetas pardillas juveniles, siendo el primer análisis hematológico de tipo descriptivo para esta especie.
2. El anticoagulante EDTA no ha sido válido para realizar análisis hematológicos en cercetas pardillas juveniles, causando lisis celular parcial y aglutinaciones.
3. No se han encontrado diferencias significativas entre la tinción Diff-Quick y la tinción Wright para el recuento diferencial de glóbulos blancos.
4. Los índices eritrocitarios han demostrado que los eritrocitos de las cercetas pardillas son relativamente grandes coincidiendo con otras anátidas documentadas y difieren en la cantidad de hemoglobina presente.
5. Los linfocitos son los leucocitos más abundantes en la cerceta pardilla seguidos por los heterófilos.

REFERENCIAS

- Andreasen, C.B., Latimer, K.S., Kircher, I.M. & Brown, J. (1989). Determination of Chicken and Turkey Plasma and Serum Protein Concentrations by Refractometry and the Biuret Method. *Avian Diseases*, 33(1), 93-96.
- Avni-Magen, N., Gancz, A. Y., Beaufrère, H., Lublin, A. & Eshar, D. (2016). Selected hematologic and plasma biochemistry analysis of ferruginous ducks (*Aythya nyroca*) in Israel. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1), 354–358. <http://dx.doi.org/10.1638/2015-0065.1>
- BirdLife International (2021). Marbled Teal (*Marmaronetta angustirostris*). *The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources Red List of Threatened Species*. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-3.RLTS.T22680339A166202694.en>
- Brooks, M. B., Harr, K. E., Seelig, D. M., Wardrop, K. J. & Weiss, D. J. (2022). *Schalm's Veterinary Hematology*. Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Campbell, T. W. & Joshua, F. (1984). Avian Hematology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 14(2), 223–248. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(84\)50031-X](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(84)50031-X)
- Campbell, T.W. (1994). Hematology. En B.W. Ritchie, G.J. Harrison & L.R. Harrison (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Applications* (pp. 176-198). Florida: Wingers Publishing.
- Campbell, T.W. & Ellis, C.K. (2007). *Avian & Exotic Animal Hematology & Cytology* (Third Edition). Iowa: Blackwell Publishing.

Campbell, T.W. & Grant, K.R. (2022). *Exotic Animal Hematology and Cytology* (Fifth Edition). Iowa: Wiley-Blackwell.

Carpenter, J.W. (2018). *Exotic Animal Formulary* (Fifth Edition). St. Louis: Elsevier.

Clark, P., Boardman, W. & Raidal, S. (2009). *Atlas of Clinical Avian Hematology*. Oxford: Wiley-Blackwell.

Cotter, P. F. (2021). Atypical hemograms of the commercial duck. *Poultry Science*, 100(8), 1-19.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101248>

Cray, C., Rodriguez, M. & Arheart, K.L. (2008). Use of refractometry for determination of psittacine plasma protein concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(4), 438-442. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00075.x>

Cray, C. (2015). Reference Intervals in Avian and Exotic Hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(1), 105–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2014.09.006>

Delai, M., Puspamitra, S., Bhattacharjee, A., Acharya, D., Acharya, G. & Mohanty, P. K. (2015). Comparative haematology of *Anas platyrhynchos* (Anseriformes) and *Coturnix coturnix japonica* (Galliformes). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(5), 50-53.

Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F. & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of the novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441-453.
<https://doi.org/10.1111/vcp.12006>

- Gaspar, H., Bargallo, F., Grifols, J., Correia, E. y Pinto, M. L. (2021). Haematological reference intervals in captive African Grey Parrots (*Psittacus erithacus*). *Vet Med-Czech*, 66 (1), 24-31.
<https://doi.org/10.17221/15/2020-VETMED>
- Gustavsson, F. (2015). *Validation study: HemoCue Hb 201 + as a tool in comparative physiological field studies on avian blood* [Examensarbete report]. Linköpings Universitet.
- Hemm, R. & Carlton, W. W. (1967). Review of Duck Hematology. *Poultry Science*, 46(4), 956–962.
<https://doi.org/10.3382/ps.0460956>
- Jahantigh, M. & Zamani-Ahmadmahmudi, M. (2016). Hematology and serum biochemistry values in graylag geese (*Anser anser*) in Southeast Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 25, 671-675.
<https://doi.org/10.1007/s00580-016-2273-6>
- Jones, M. P. (2015). Avian Hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(1), 51-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2014.09.012>
- Meoño-Sánchez, E.R., Fuentes-Rousselin, H.E., Villatoro-Chacón, D., Talgi, Y., Peralta-Moreno, K. y Guerra-Centeno, D. (2016). Hematología y química sérica del pijije de ala blanca (*Dendrocygna autumnalis*): valores de referencia. *Redvet*, 17(11), 1-9.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2014). *Estrategia para la conservación de la Cerceta Pardilla (Marmaronetta angustirostris), Focha moruna (Fulica cristata) y Malvasía cabeciblanca (Oxyura leucocephala) en España*.
https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/publicaciones/pbl_estrategia_cerceta_focha_malvasia_tcm30-197259.pdf

Ministerio de Medio Ambiente (2006). *Resumen La Cerceta Pardilla.*

https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies-amenazadas/resumen_tcm30-195414.pdf

Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) (2021). *La población de cerceta pardilla supera las 700 crías en 2021, el mejor registro en la última década.*

<https://www.miteco.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/la-población-de-cerceta-pardilla-supera-las-700-cr%C3%ADas-en-2021-el-mejor-registro-en-la-última-década/tcm:30-534460>

Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) (2022). *Cerceta Pardilla: El Pato más amenazado de Europa. LIFE Cerceta Pardilla.* <https://www.cerceta-pardilla.es>

Pranoto, H. & Nugrahalia, M. (2020). A Study on Sex-Based Hematology and Biochemistry of Lesser Whistling Duck (*Dendrocygna javanica*). *International Journal of Poultry Science*, 19(3), 124-129.

<https://dx.doi.org/=ijps.2020.124.129>

Prokić, V.S., Davidov, I., Belić, B., Novakov, N., Aleksić, J. & Lakić, I. (2019). Morphometric Parameters of Erythrocytes in Juvenile Mandarin Ducks (*Aix galericulata*). *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21(2),

1-6. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0972>

Sakas, P.S. & Bauck, L. (2002). *Essentials of Avian Medicine: A Guide for Practitioners* (Second Edition).

Lakewood: American Animal Hospital Association.

Samour, J. (2005). Diagnostic Value of Hematology. En G.J. Harrison & T.L. Lightfoot (Eds.), *Clinical Avian Medicine* (Volumen II, pp. 587-610). Florida: Spix Publishing.

Sánchez-Torres, L., Arredondo-Castro, M., Orozco-Benítez, G., Gutiérrez-Arenas, D., Carrillo-Beltrán, J., Lepe-Aguilar, R. y Avila-Ramos, F. (2021). Variables hematológicas en aves deportivas, ganso común, pato doméstico, pato azteca, guajolote y pollo de engorde. *Abanico Agroforestal*, 3, 1-10. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2021.3>

Schmidt, E. M. S., Lange, R. R., Ribas, J. M., Daciuk, B. M., Montiani-Ferreira, F. & Paulillo, A. C. (2009). Hematology of the Red-Capped Parrot (*Pionopsitta pileata*) and Vinaceous Amazon Parrot (*Amazona vinacea*) in Captivity. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40 (1), 15–17. <http://dx.doi.org/10.1638/2007-0054.1>

Velguth, K. E., Payton, M. E. & Hoover, J. P. (2010). Relationship of Hemoglobin Concentration to Packed Cell Volume in Avian Blood Samples. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 24(2), 115–121. <https://doi.org/10.1647/2008-042.1>

ANEXOS

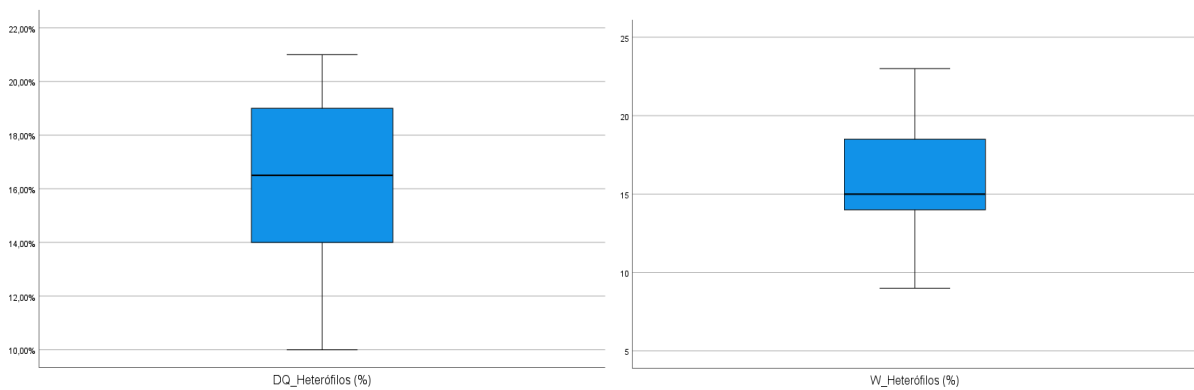
ANEXO I: DIAGRAMAS DE CAJAS Y BIGOTES DE LEUCOCITOS EN TINCIÓN DIFF-QUICK Y EN TINCIÓN WRIGHT

Se observan gráficamente los diagramas de cajas y bigotes comparados por tinción (siendo W: tinción Wright y DQ: tinción Diff-Quick) y tipo de célula blanca, habiéndose eliminado previamente los puntos atípicos:

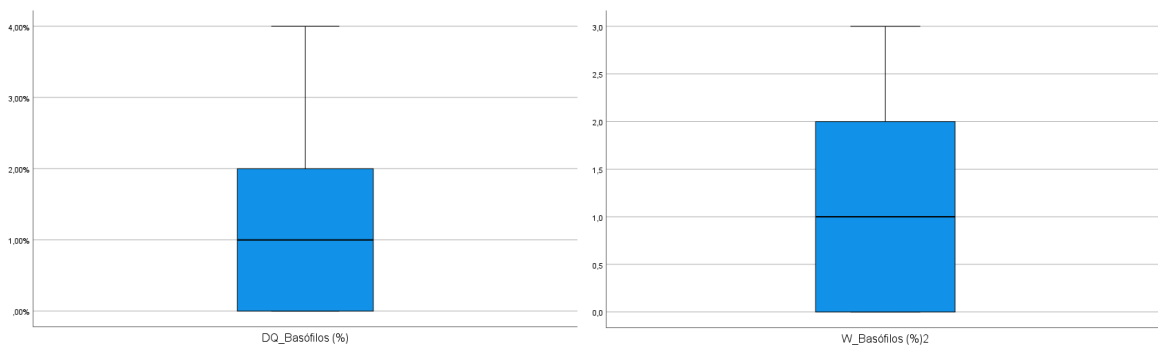
a) Diagramas de cajas y bigotes para eosinófilos



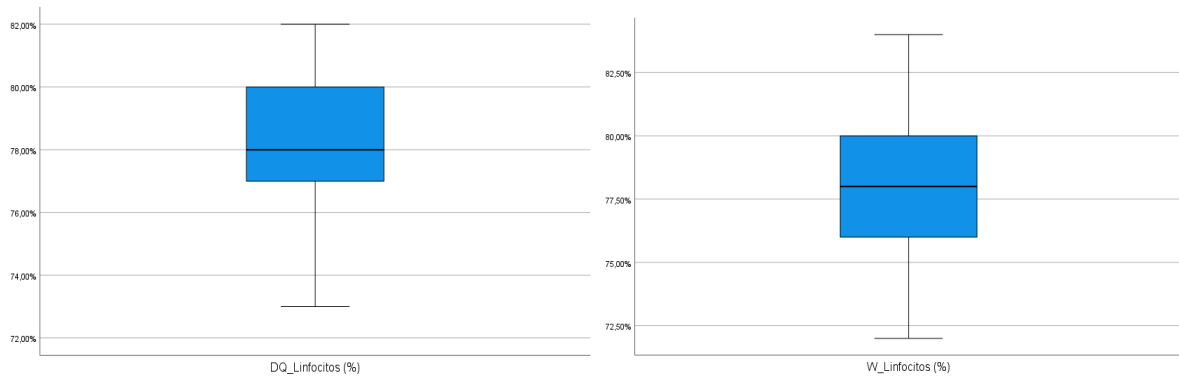
b) Diagramas de cajas y bigotes para heterófilos



c) Diagramas de cajas y bigotes para basófilos



d) Diagramas de cajas y bigotes para linfocitos



e) Diagramas de cajas y bigotes para monocitos

