

INTRODUZIONE ALL'EMATOLOGIA DEI PESCI*

TERRY CAMPBELL, DVM, PhD
Kansas State University

FRANK MURRU, BS
Sea World of Florida, Inc.
Orlando, Florida

L'ematologia è ormai un utile mezzo diagnostico di routine nella medicina dell'uomo e dei mammiferi domestici e sta diventando tale anche nella valutazione clinica degli uccelli. Analogamente, può fornire indicazioni utili nell'identificazione delle malattie che influiscono sugli elementi del sangue periferico dei pesci.

La medicina veterinaria si è sviluppata sulla base di un interesse primario per la salute dei mammiferi e degli uccelli domestici allevati per il consumo umano. Oggi, la veterinaria ha allargato il suo campo di interesse estendendola a molte specie di animali da compagnia ed esotici. I veterinari intervengono nella produzione di specie ittiche per fini commerciali (alimentari ed ornamentali), nella cura delle specie da esposizione degli zoo e degli acquari, ed in quella dei pesci tenuti come animali da compagnia.

Le 20.000 specie ittiche note sono suddivise nelle seguenti tre classi: Agnati (pesci privi di mandibola), Condroititi (pesci cartilaginei) e Osteititi (pesci ossei). Gran parte delle attuali conoscenze relative all'ematologia dei pesci derivano da ricerche effettuate sulle lamprede e sui missinoidi (classe Agnati), su poche specie di pesci cartilaginei della sottoclasse degli Elasmobranchi (cioè, squali), e alcune specie di pesci ossei del sottordine dei Teleostei (cioè, anguille, salmonidi, pesci gatto, carpe e pesci rossi). Lo sviluppo dell'ematologia dei pesci è piuttosto arretrato rispetto a quella degli uccelli e dei mammiferi; tuttavia, i progressi di questa scienza come mezzo diagnostico nella medicina dei pesci dipenderanno dalle indagini cliniche condotte sull'emogramma delle specie ittiche.

IL TESSUTO EMPOIETICO DEI PESCI

Tutti i pesci sono privi di midollo osseo e linfonodi. I principali tessuti emopoietici delle specie ittiche sono il timo, la milza e i grandi tessuti linfomioidi (organo epigonale ed organo di Leydig).^{1,2} I tessuti emopoietici primari dei pesci ossei sono il timo, la milza ed il rene.¹

La localizzazione e la struttura del timo variano da una specie ittica all'altra; la maggior parte delle cellule riscontrate in quest'organo è costituita da linfociti. Nei Teleostei,

il timo è il principale organo linfoide e durante lo sviluppo sembra "seminare" di linfociti (probabilmente di tipo T) il rene e la milza.^{3,4} Il timo dei pesci di solito non è suddiviso nettamente in zone corticali e midollari.^{1,4,5} Nei Teleostei, l'organo è strettamente associato all'epitelio faringeo. Questa associazione può consentire l'esposizione dei linfociti al materiale antigenico proveniente dall'acqua circostante nell'ambito di una funzione timica immunocorrelata.

La milza delle specie cartilaginee è simile a quella delle specie ossee. Nei pesci di entrambe le classi quest'organo è di solito localizzato sulla superficie lateroventrale dello stomaco o in posizione adiacente allo stomaco ed all'intestino. La milza dei condroititi contiene aree di polpa bianca e polpa rossa.¹

Quest'ultima presenta cellule coinvolte nell'emopoiesi (trombopoiesi, eritropoiesi e linfopoiesi), plasmacellule, macrofagi e granulociti maturi. Non esistono distinzioni nette fra la polpa rossa e quella bianca nella milza degli osteoititi e le aree di eritropoiesi e linfopoiesi sono mescolate le une alle altre.⁶ In alcuni teleostei, la milza contiene l'unico tessuto emopoietico; invece, in altri pesci del medesimo sottordine, lo stesso organo agisce come sede secondaria di emopoiesi.⁷

I grandi tessuti linfomioidi dei pesci cartilaginei sono rappresentati dall'organo epigonale e da quello di Leydig. Queste formazioni sono associate alla granulopoiesi ed alla produzione anticorpale. L'organo epigonale è correlato alle gonadi e costituisce il più grande tessuto linfomioloide in alcuni squali. L'organo di Leydig è localizzato nella sottomucosa del tratto digerente (cioè dell'esofago) ed ha una struttura simile a quella dell'organo epigonale. Entrambi questi organi contengono plasmacellule, linfociti e granulociti in via di sviluppo.²

Il rene è il principale organo emopoietico dei pesci ossei e può essere suddiviso in due componenti – il rene craniale (pronefro o rene della testa) e rene principale (opistonefro o rene del tronco)^{1,7}. Il tessuto emopoietico del rene è la sede dell'eritropoiesi, della granulopoiesi, della linfopoiesi e della monocitopoiesi. Il rene è anche coinvolto nell'intrappolamento degli antigeni e nella formazione degli anticorpi.

Sedi emopoietiche minori nei pesci sono il fegato ed il sangue periferico. Gli stadi finali dello sviluppo eritroide possono avvenire nel sangue periferico dei pesci cartilaginei e di quelli ossei.

*Da "The Compendium Collection", Vol. 12, N.4. Con l'autorizzazione dell'Editore.

PRELIEVO DI SANGUE

Nei pesci di grandi dimensioni, il prelievo di sangue può essere effettuato con vari metodi.⁸ Nei soggetti anestetizzati o non anestetizzati risulta di facile esecuzione la puntura della vena caudale. Quest'ultima può essere raggiunta inserendo nel setto medioventrale del peduncolo caudale un ago (di dimensioni appropriate a seconda della taglia del pesce) raccordato ad una siringa e dirigendolo perpendicolarmente verso le vertebre. Una volta che l'ago abbia preso contatto con una vertebra caudale, potrà essere leggermente retratto in modo che la sua estremità si venga a trovare nella vena caudale.

Il sangue dovrebbe essere aspirato in una siringa di plastica. Poiché quello dei pesci coagula rapidamente a contatto con il vetro, si raccomandano le siringhe di plastica.⁹ Gli anticoagulanti utilizzabili per rivestire le pareti interne dell'ago e della siringa prima del prelievo sono l'eparina e l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA).

Si può anche effettuare un approccio laterale alla vena caudale, inserendo l'ago appena al di sotto della linea laterale della coda e dietro l'ano.⁸ L'ago viene fatto avanzare verso la linea mediana, appena al di sotto della vertebra caudale, fino a raggiungere la vena.

Il prelievo può essere effettuato anche dal *bulbus cordis* dei teleostei inserendo un ago in posizione leggermente caudale rispetto all'apice della parte del pesce a forma di

D.⁸ Si penetra tenendo l'ago perpendicolare alla cute e si esercita una lieve pressione sulla siringa mentre l'ago viene fatto progredire verso il *bulbus cordis*.

Nei pesci di piccole dimensioni, il sangue viene spesso prelevato prima di una necropsia, quando si sacrificano alcuni soggetti malati per stabilire la natura di un processo patologico che ha colpito più esemplari di un serbatoio o di un laghetto. Il sangue può essere prelevato dal cuore attraverso l'apertura della cavità celomatica di un pesce anestetizzato (allo scopo, è possibile utilizzare vari agenti chimici).¹⁰ Il prelievo può anche essere effettuato dalla vena caudale dopo aver reciso il peduncolo della coda; il sangue viene lasciato gocciolare in un tubo capillare. Lo svantaggio di questo metodo è dato dal maggior rischio di contaminazione del campione da parte di fluidi tissutali non ematici.

Il sangue dei teleostei coagula facilmente e, come quello della maggior parte dei pesci, è caratterizzato da elementi corpuscolati sensibili alle variazioni osmotiche. L'emolisi costituisce quindi un riscontro comune nei campioni di sangue prelevati dalle specie ittiche. Sullo sfondo dei preparati allestiti con il sangue di pesce si osserva spesso una sostanza densa, pallida ed eosinofila, che può essere correlata al grado di emolisi. Lo spessore del materiale di sfondo nei preparati colorati e lasciati asciugare all'aria può interferire con la distribuzione delle cellule, facendo sì che queste appaiano piccole e condensate. Gli elementi

RADIOLOGIA

APPARECCHIATURE
PELLICOLE RX
CAMERE OSCURE

ANESTESIA
ELETTROBISTURI
EL. CARDIOGRAFI

ELETTROMEDICALI



SAS

di LUCARELLI M. & C.

UFFICIO COMMERCIALE
20095 CUSANO MILANINO (MI)

Via Isonzo, 8

Tel. 02-66401060

Fax 02-66400884

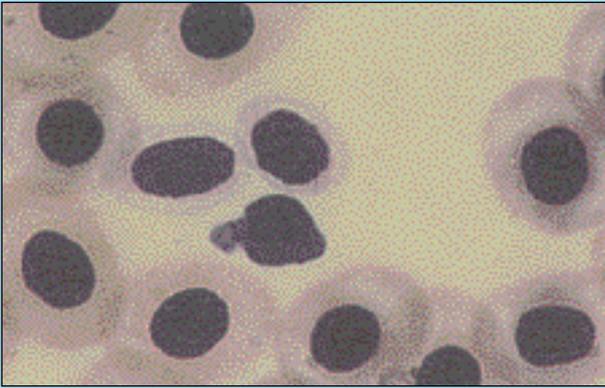


FIGURA 1 - Eritrociti di uno squalo limone (*Negaprion brevirostris*). Si noti la policromasia (colorazione di Wright).

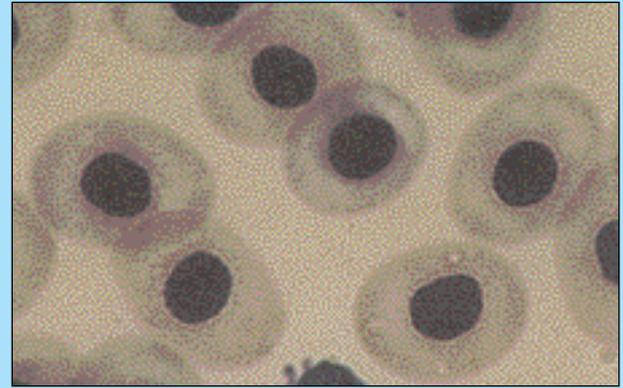


FIGURA 2 - Un piccolo linfocita maturo e due trombociti di uno squalo limone (*Negaprion brevirostris*) (colorazione di Wright).

cellulari negli strisci ematici caratterizzati da un abbondante materiale di sfondo possono essere quindi difficili da identificare.

Il sangue dei pesci contiene eritrociti nucleati, trombociti, linfociti, granulociti, monociti e plasma. Quest'ultimo è composto da ioni inorganici, zuccheri, fattori della coagulazione, globuline (α , β e γ) ed albumine (tranne che negli elasmobranchi). L'equilibrio osmotico nel sangue dei teleostei è mantenuto dagli ioni inorganici (Na^+ e K^+), mentre quello degli elasmobranchi è isosmotico rispetto all'acqua di mare e l'urea viene ritenuta per l'equilibrio osmotico.¹ Queste caratteristiche possono spiegare la fragilità degli elementi cellulari del sangue degli squali quando vengono esposti agli anticoagulanti. Utilizzando sangue privo di anticoagulanti è quindi possibile migliorare la qualità degli strisci ematici degli elasmobranchi.

ERITROCITI

Le dimensioni ed il numero degli eritrociti nel sangue dei pesci variano da una specie all'altra e con le diverse condizioni fisiologiche all'interno della stessa specie.¹¹ Gli eritrociti dei pesci adulti negli strisci colorati con il metodo di Wright appaiono ovali o ellissoidali, con un citoplasma abbondante, pallido ed eosinofilo, ed un nucleo in posizione centrale (Fig. 1).

Il nucleo è solitamente ovale, con l'asse maggiore parallelo a quello della cellula. In alcune specie, può apparire tondeggiantemente. La cromatina nucleare addensata assume una colorazione porpora scuro. Il citoplasma degli eritrociti maturi di alcune specie ittiche non presenta un aspetto omogeneo e, spesso, contiene una quantità variabile di aree più rarefatte (pallide). Negli eritrociti maturi osservati al microscopio elettronico si possono riscontrare vacuoli citoplasmatici prominenti. Questi ultimi possono essere dovuti ad una vacuolizzazione autofagica derivata da mitocondri degenerati.¹²

Una policromasia ed anisocitosi di entità lieve o moderata è normale in molte specie ittiche e suggerisce una certa maturazione finale degli eritrociti nel sangue periferico. Gli eritrociti giovani appaiono arrotondati con citoplasma di colore blu chiaro e presentano una cromatina nucleare vescicolare in confronto a quella degli eritrociti maturi.

Gli elementi iniziali della linea eritrocitaria (eritroblasti e proeritrociti) si riscontrano occasionalmente nel sangue periferico dei pesci. Queste cellule sono tondeggianti con un nucleo in posizione centrale che contiene una cromatina uniforme o reticolata e una scarsa quantità di citoplasma intensamente basofilo. Man mano che gli eritrociti immaturi evolvono verso la maturità, la basofilia del citoplasma diminuisce con il progressivo incremento del contenuto di emoglobina. Gli eritrociti immaturi contengono degli organuli (apparato di Golgi, mitocondri, ribosomi, centrioli e reticolo endoplasmatico liscio e ruvido) che scompaiono negli elementi maturi.^{1,13}

Gli eritrociti trasportano ossigeno e biossido di carbonio. Tutti i pesci, tranne gli agnati, possiedono eritrociti che contengono emoglobina con le tipiche catene α e β che formano un tetramero.¹⁴ Come quella degli uccelli e dei mammiferi, anche l'emoglobina dei pesci permette il rilascio dell'ossigeno ai tessuti con un'elevata concentrazione di biossido di carbonio.

Nel sangue periferico dei pesci si possono riscontrare eritrociti di aspetto anormale che possono indicare una patologia eritrocitaria. I pesci con anemia rigenerativa mostrano spesso un incremento della policromasia e del numero di eritrociti immaturi nel sangue periferico. Gli stress ambientali, come l'incremento della densità di popolazione, possono essere causa di anemia microcitica normocromica. I perossidi prodotti da microrganismi possono danneggiare gli eritrociti, determinando un'anemia microcitica ipocromica con formazione di eritrociti allungati.¹⁶ Anche le carenze nutrizionali e la inquinazione idrica possono determinare alterazioni della morfologia eritrocitaria.^{17,18}

LINFOCITI

I linfociti sono i leucociti più comunemente riscontrati nel sangue periferico di molte specie ittiche. Nel sangue periferico dei pesci sono stati descritti i seguenti tre tipi di linfociti: maturi, immaturi (linfoblasti) e plasmacellule. I primi sono cellule piccole che tendono ad essere rotonde, ma possono anche presentare un profilo irregolare o sagomarsi adattandosi alla forma di quelle adiacenti (Fig. 2). Presentano un rapporto nucleo/citoplasmatico elevato ed un nucleo che assume una colorazione porpora scuro e mostra ammassi di

cromatina grossolani. Il nucleo tondeggiante è circondato da un sottile citoplasma omogeneamente blu.

Il significato della presenza dei linfociti immaturi nel sangue periferico dei pesci è controverso. Alcune di queste cellule possono rappresentare linfociti reattivi che stanno rispondendo ad una stimolazione antigenica. Le plasmacellule (che sono forme reattive di linfociti B) si riscontrano occasionalmente nel sangue periferico dei pesci. L'esame al microscopio elettronico delle plasmacellule mostra un reticolo endoplasmatico ruvido rigonfio ed un apparato di Golgi attivo, impegnato nella sintesi delle immunoglobuline.¹ La maggior parte dei linfociti riscontrati nel sangue periferico dei pesci è piccola e matura.

È anche oggetto di controversia l'esistenza o meno di un sistema linfatico nelle specie ittiche. I pesci cartilaginei ed alcuni di quelli ossei presentano un sistema emolinfatico, perché gli eritrociti sono tipicamente associati ad un fluido linfatico.¹⁹ In alcuni teleostei si riscontra un sistema linfatico costituito da 4 dotti sottocutanei ed uno o due dotti sottovertebrali (ciascuno di questi dotti presenta vasi di connessione più piccoli e sistemi di propulsione della linfa [strutture similcardiache]).¹ I pesci non possiedono linfonodi o vasi linfatici che contengano valvole.¹

I linfociti dei pesci intervengono nell'immunità cellulare ed umorale e il contatto con gli antigeni porta a proliferazione linfocitaria, produzione di immunoglobuline ed attivazione dei linfociti T. La maggior parte dei pesci produce immunoglobuline molto simili alle IgM degli altri vertebrati ed esistono dati che indicano che possono produrre altre classi o sottoclassi di immunoglobuline.^{1,20} Le sedi di produzione anticorpale nei pesci cartilaginei sono principalmente rappresentate dalla milza e dalla lamina propria della mucosa intestinale; una produzione di minore intensità si ha a livello di fegato, organo epigonale ed organo di Leydig.^{1,21} Il rene e la milza sono le principali sedi di produzione anticorpale nei teleostei.²² Il muco che riveste i pesci contiene immunoglobuline, agglutinine e lisozima, per cui svolge un'importante funzione di protezione da parassiti e microrganismi.¹

I glucocorticoidi esogeni possono determinare una ridu-

zione del numero di linfociti circolanti nel sangue periferico dei pesci.²³ Di conseguenza, nei pesci esposti a stress di vario tipo (ad esempio, malattie infettive o condizioni ambientali avverse) il conteggio dei linfociti periferici può essere basso.

GRANULOCITI

La nomenclatura e la classificazione dei granulociti dei pesci sono controverse, probabilmente a causa della variabilità di questi elementi fra le specie ittiche. Questa confusione può anche essere complicata dal tentativo di classificare queste cellule sulla base del loro aspetto negli strisci ematici colorati con una tecnica di tipo Romanowsky e secondo la nomenclatura utilizzata nell'ematologia dei mammiferi domestici. Recenti studi relativi alle caratteristiche ultrastrutturali, alla valutazione citochimica ed ai test di funzione leucocitaria hanno iniziato a risolvere alcune delle controversie relative ai granulociti dei pesci. I granulociti dei pesci cartilaginei e di quelli ossei devono essere considerati due tipi cellulari separati.

Apparentemente, esistono delle sottopopolazioni di granulociti eosinofili (da non confondere con le cellule analoghe agli eosinofili dei mammiferi) nel sangue periferico degli Elasmobranchi. La classificazione granulocitaria utilizzata per il gattuccio (*Scyliorhinus canicula*) può servire da modello per quella dei pesci cartilaginei.

Il tipo più comune di granulociti è quello G₁ (tipo I).^{1,24,25} Queste cellule possiedono un nucleo eccentrico, irregolare e non lobato e granuli citoplasmatici evidenti, tondeggianti od ovali ed eosinofili. Al secondo posto in ordine di frequenza si trovano i granulociti G₄ (tipo IV), cellule allungate contenenti granuli citoplasmatici moderatamente eosinofili. Questi elementi sono spesso confusi con trombociti reattivi, che tendono ad essere più piccoli ed a presentarsi in ammassi. Un terzo tipo di granulociti riscontrato nel gattuccio (*Scyliorhinus canicula*) è quello G₃ (tipo III), che possiede un nucleo lobato e granuli citoplasmatici fortemente eosinofili di forma bastoncellare (Fig. 3). I granulociti (tipo II) vengono spesso indicati come granu-

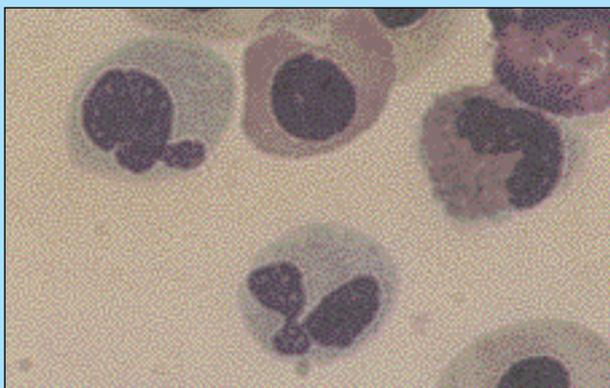


FIGURA 3 - Un granulocita di tipo G3 e due di tipo G2 di uno squalo limone (*Negaprion brevirostris*) (colorazione di Wright).

lociti neutrofili (Fig. 3). Presentano un nucleo leggermente dentellato o lobato e granuli citoplasmatici eterogenei di piccole dimensioni. I granulociti G₂ sono i meno comuni fra i quattro tipi riscontrati nel gattuccio (*Scyliorhinus canicula*).

I tipi di granulociti presenti nelle specie ittiche cartilaginee variano. Ad esempio, lo squalo nutrice (*Ginglymostoma cirratum*) possiede solo una popolazione di granulociti eosinofili mentre le razze sembrano avere due popolazioni predominanti (simili ai granulociti G₁ e G₃ del gattuccio) di queste cellule, ma essere completamente privi del tipo G₄.^{13,25}

La maggior parte degli autori che si occupano della classificazione dei granulociti del sangue periferico dei pesci ossei si basa su studi effettuati utilizzando ciprinidi (pesce rosso e carpa), salmonidi (salmone e trota) ed ictaluridi (pesce gatto). Il pesce rosso (*Carassius auratus*) possiede granulociti neutrofili (eterofili) ed eosinofili.¹ I primi presentano un nucleo lobato ed eccentrico ed un citoplasma grigio chiaro che contiene piccoli granuli di colore variabile dal grigio al rosa pallido. Gli eosinofili tendono ad essere tondeggianti e più piccoli dei neutrofili (eterofili) e a possedere un nucleo rotondo o bilobato situato in posizione eccentrica all'interno della cellula. Il citoplasma si colora in blu chiaro e contiene granuli pallidi, sferici o bastoncellari.

I granulociti della carpa (*Cyprinus carpio*) sono simili a quelli del pesce rosso.²⁶⁻²⁸ Nei salmonidi, i granulociti predominanti sono i neutrofili (eterofili); gli eosinofili sono assenti o rari.¹ Il pesce gatto (*Ictalurus punctatus*) presenta dei neutrofili (eterofili) con granuli citoplasmatici bastoncellari.²⁹ Il centro dei granuli maturi ha un aspetto cristallino. Il nucleo dei neutrofili (eterofili) dei pesci ossei mostra degli ammassi grossolani di cromatina ed assume una colorazione porpora scuro con il metodo di Wright.

È oggetto di controversia l'esistenza o meno dei basofili nel sangue periferico dei pesci. Il possesso di questi elementi è stato descritto soltanto in poche specie. Se esistono, i basofili sono presenti in numero molto basso.^{30,31}

La funzione dei granulociti dei pesci è simile a quella dei neutrofili dei mammiferi. Questi elementi migrano verso le sedi di infiammazione, dove partecipano all'attività fagocitaria.³² Inoltre, mostrano delle risposte chemio-cinetiche come i neutrofili dei mammiferi. Tuttavia, va sot-

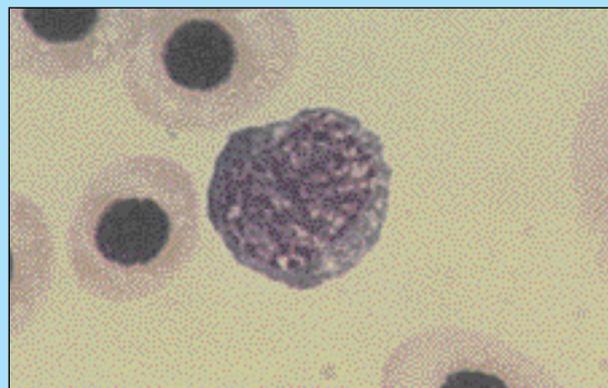


FIGURA 4 - Un monocita di uno squalo limone (*Negaprion brevirostris*) (colorazione di Wright).

tolineato che, benché alcuni granulociti dei pesci mostrino una reazione tintoriale eosinofila con le tecniche di tipo Romanowsky, questo riscontro non suggerisce che queste cellule abbiano la stessa morfologia o funzione degli eosinofili dei mammiferi.

MONOCITI

I monociti sono presenti in basso numero nel sangue periferico della maggior parte dei pesci (Fig. 4). Sono grandi leucociti con un abbondante citoplasma di colore blu-grigio, privi di granuli ed occasionalmente vacuolizzati. Il nucleo occupa meno del 50% del volume cellulare, è localizzato in posizione eccentrica ed ha una forma variabile (tondeggiante o lobata). La cromatina nucleare è grossolanamente granulare o reticolata e priva degli ammassi spessi tipici dei nuclei dei linfociti. I margini cellulari possono essere indistinti o irregolari a causa della presenza di pseudopodi (proiezioni protoplasmatiche). L'ultrastruttura dei monociti indica l'esistenza di analogie fra le cellule di questo tipo nelle varie specie ittiche studiate.¹

Soluzione di Natt ed Herrick⁴⁰

Componenti

NaCl	3,88 g
Na ₂ SO ₄	2,50 g
[Na ₂ HPO ₄][H ₂ O] ₁₂	2,91 g
Formalina (37%)	7,50 ml
Violetto di genziana 2B	0,10 g

Preparazione

I componenti vengono dissolti in acqua distillata sino ad un volume totale di 1 l. La soluzione viene lasciata sedimentare durante la notte e filtrata attraverso una carta da filtro Whatman numero 2 prima dell'uso.

I monociti prendono parte alle lesioni infiammatorie e sono elementi fagocitari.³² Quelli presenti nel sangue dei pesci migrano verso le aree di infiammazione e, apparentemente, evolvono in macrofagi. I macrofagi isolati dai pesci sono fagocitari e sintetizzano vari prodotti di secrezione (interleuchina, interferon, prostaglandine e leucotrieni).¹ I macrofagi dei pesci sono anche coinvolti nell'intrappolamento e nella presentazione dell'antigene; quindi sono una componente importante della sorveglianza immunitaria delle specie ittiche.

TROMBOCITI

I trombociti osservati negli strisci di sangue periferico dei pesci presentano una morfologia variabile (Fig. 2). Le tre forme comunemente osservate negli strisci colorati con le tecniche di tipo Romanowsky sono quelle tondeggianti, allungata e fusiforme. La forma può variare con lo stadio di maturità o il grado di reattività. L'ultrastruttura dei trombociti dei pesci presenta caratteristiche simili ai trombociti dei mammiferi.¹ Come queste ultime, i trombociti ittici tendono ad ammassarsi nei preparati (Fig. 5).

La forma del nucleo dei trombociti segue quella della cellula. Il nucleo assume una colorazione porpora scuro e contiene una cromatina densa. Il citoplasma è incolore o blu chiaro.

I trombociti dei pesci intervengono nella coagulazione del sangue, che è simile a quella degli uccelli e dei mammiferi.³³ Il meccanismo di aggregazione trombocitaria, tuttavia, può non essere lo stesso di quello dell'aggregazione delle piastrine dei mammiferi.

EMATOLOGIA CLINICA DEI PESCI

L'ematologia prevede la valutazione degli eritrociti, dei leucociti e dei trombociti in campioni di sangue periferico. La determinazione dell'ematocrito è un metodo semplice e rapido per valutare lo status degli eritrociti negli uccelli e nei mammiferi. Nei pesci, questo parametro varia da una specie all'altra ed all'interno di una singola specie. A causa di questa variabilità, il suo valore per la valutazio-

ne dello stato di salute del pesce è stato considerato discutibile.^{1,34-38}

Per determinare la concentrazione dell'emoglobina nel sangue dei pesci si possono utilizzare vari metodi. La tecnica della cianmetaemoglobina sembra fornire risultati più costanti rispetto alle altre.³⁹ Dopo aver effettuato la lisi degli eritrociti, il campione va centrifugato per eliminare i nuclei liberi degli eritrociti prima di effettuare la lettura spettrofotometrica per ottenere la misurazione della concentrazione dell'emoglobina.

Il conteggio totale degli eritrociti può essere effettuato con metodi manuali che utilizzano varie soluzioni diluenti e con un emocitometro (Fig. 6).

Il sangue può essere diluito utilizzando il sistema Unopette® (Becton-Dickinson) per gli eritrociti, oppure servendosi di una pipetta da diluizione per eritrociti (pipetta da globuli rossi) ed un fluido diluente come la soluzione di Natt e Herrick (vedi riquadro). Entrambi i sistemi consentono di ottenere una diluizione 1:200 e il sangue diluito viene utilizzato per riempire entrambi i lati di un emocitometro di Neubauer migliorato (American Optical).

Gli eritrociti nei 4 quadrati piccoli agli angoli e nel quadrato centrale dell'emocitometro vengono contati su entrambi i lati. Si calcola il numero medio degli eritrociti dei due lati dell'emocitometro e lo si moltiplica per 10.000 per ottenere il conteggio totale degli eritrociti per mm³ di sangue. La morfologia eritrocitaria viene determinata in base all'aspetto delle cellule in uno striscio di sangue colorato con il metodo di Wright.

Il conteggio totale dei leucociti può essere effettuato utilizzando vari fluidi diluitori e coloranti, come la soluzione di Shaw, il fluido di Rees-Ecker, quello di Dacie e la soluzione di Natt ed Herrick.⁴⁰⁻⁴⁴ Un fluido diluente e colorante, come la soluzione di Natt ed Herrick, può consentire di effettuare con lo stesso emocitometro carico la determinazione del numero totale di eritrociti, leucociti e trombociti.

Quando si effettua la determinazione del conteggio totale dei leucociti con la stessa diluizione 1:200 utilizzata per ottenere il numero degli eritrociti, si devono contare i leucociti presenti in tutti e nove i quadrati grandi di entrambi i lati dell'emocitometro. Il numero medio di leucociti per nove quadrati grandi più il 10% dello stesso

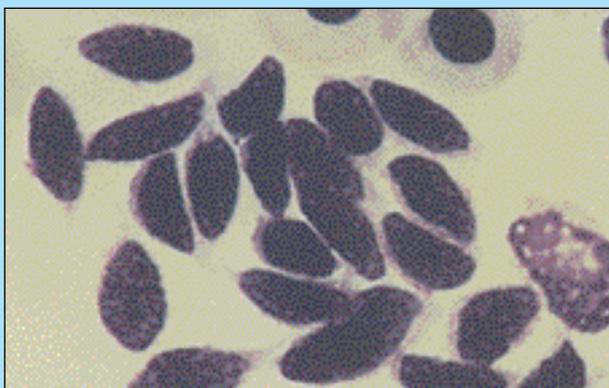


FIGURA 5 - Trombociti ammassati con granuli citoplasmatici eosinofili che indicano una reattività. Il campione è stato prelevato da uno squalo limone (*Negaprion brevirostris*) (colorazione di Wright).

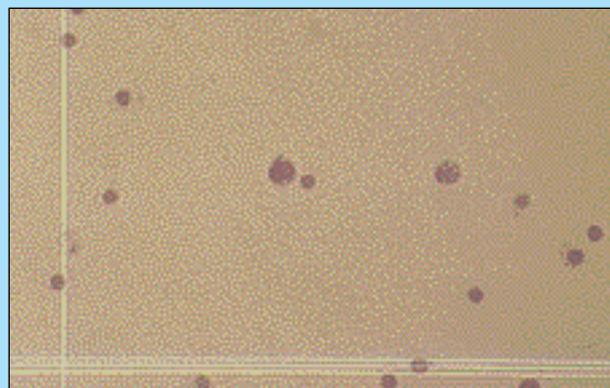


FIGURA 6 - Aspetto degli eritrociti e di due leucociti in un emocitometro (soluzione di Natt ed Herrick).

numero viene moltiplicato per 200 per ottenere il conteggio totale dei leucociti per mm^3 di sangue:

$$\text{leucociti/mm}^3 = (\text{numero di leucociti in nove quadrati grandi} + 10\%) \times 200$$

Quando si utilizza la soluzione di Natt ed Herrick, i leucociti appaiono di colore blu e più intensamente colorati degli eritrociti. Questi ultimi sono tipicamente ovali e presentano un nucleo piccolo e blu scuro circondato da un citoplasma incolore o rosa molto pallido. I leucociti granulocitari hanno un citoplasma granulare. La valutazione dei leucociti viene completata dal calcolo della formula eritrocitaria effettuata su uno striscio di sangue periferico colorato.

Il conteggio totale dei trombociti può essere calcolato utilizzando lo stesso emocitometro caricato con sangue diluito servendosi della medesima diluizione utilizzata per ottenere il numero totale di eritrociti e leucociti. Quando si utilizza la soluzione di Natt ed Herrick, i trombociti somigliano agli eritrociti, ma sono molto più piccoli e presentano un rapporto nucleo/citoplasmatico più elevato. Per ottenere il conteggio totale dei trombociti, si devono contare gli elementi di questo tipo presenti in tutti i quadrati piccoli del quadrato centrale grande di entrambi i lati dell'emocitometro. Il numero medio di trombociti in un quadrato grande viene moltiplicato per 2000 per ottenere il numero totale per ciascun mm^3 di sangue.

CONCLUSIONI

L'ematologia clinica si è dimostrata un utile mezzo diagnostico nella medicina degli uccelli, dei mammiferi e dell'uomo. Numerosi autori si sono impegnati a studiare la morfologia e la funzione degli elementi cellulari del sangue dei pesci. Compete alla professione veterinaria sviluppare le applicazioni cliniche di queste utili informazioni. Allo scopo, si potrebbero applicare le tecniche dell'ematologia clinica ai pesci (normali ed anormali) osservando le modificazioni cellulari che si verificano nel sangue periferico di questi animali.

Note sugli Autori

Quando questo articolo è stato inviato per la pubblicazione, il Dr. Campbell era affiliato al Department of Surgery and Medicine, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas. Attualmente, l'autore opera presso il Sea World of Florida, Orlando, Florida. Mr. Murru è General Curator, Sea World of Florida.

Bibliografia

- Rowley AF, et al: Fish, in Rowley AF, Ratcliffe HA (eds): Vertebrate Blood Cells. New York, Cambridge University Press, 1988, pp 19-127.
- Fange R, Pulsford A: Structural studies on lymphomyeloid tissues of the dogfish, *Scyliorhinus canicula* L. Cell tissue Res 230:337-351, 1983.
- Grace MF, Manning MJ: Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Dev Comp Immunol 4:255-264, 1980.
- Bly JE: The ontogeny of the immune system in the viviparous teleost *Zoarcas viviparus* L., in Manning MJ, Tatner MF (ed): Fish Immunology. New York, Academic Press, 1985, pp 327-341.
- Manning MJ: A comparative view of the thymus in vertebrates, in Kendall MD (ed): The Thymus Gland. New York, Academic Press, 1981, pp 7-20.
- Takashima F, Spleen, in Hibiya T (ed): An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Tokyo, Kodansha Ltd, 1985, pp 62-64.
- Catton WT: Blood cell formation in certain teleost fishes. Blood 6:39-60, 1951.
- Campbell TW: Fish cytology and hematology. Vet Clin North Am [Small Anim Pract] 18(2):349-364, 1988.
- Smith GC, Lewis WM, Kaplan HM: A comparative morphologic and physiologic study of fish blood. Prod Fish Cult 14:169-172, 1952.
- Brown LA: Anesthesia in fish. Vet Clin North Am [Small Anim Pract] 18(2):317-330, 1988.
- Yokote M: Blood, in Hibiya T (ed): An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Tokyo, Kodansha Ltd, 1985, pp 64-72.
- Stokes EE, Firkin BG: Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. Br J Haematol 20:427-435, 1971.
- Hyder SL, Cayer ML, Pettey CL: Cell types in peripheral blood of the nurse shark: An approach to structure and function. Tissue Cell 15:437-455, 1983.
- Coates ML: Hemoglobin function in the vertebrates: An evolutionary model. J Mol Evol 6:285-307, 1975.
- Murray SA, Burton CB: Effects of density on goldfish blood-II. Cell morphology. Comp Biochem Physiol 62A:559-562, 1979.
- Sanchez-Muiz FJ, De LaHigüera M, Varela G: Alterations of erythrocytes of the rainbow trout *Salmo gairdneri* by the use of *Hansenula anomala* yeast as sole protein source. Comp Biochem Physiol 72A:693-696, 1982.
- Ellis AE: Bizarre forms of erythrocytes in a specimen of plaice, *Pleuronectes platessa* L. J Fish Dis 7:411-414, 1984.
- Eiras JC: Erythrocyte degeneration in the European eel, *Anguilla anguilla*. Bull Eur Assoc Fish Pathol 3:8-10, 1983.
- Hildebrand M: Analysis of Vertebrate Structure, ed 2. New York, Wiley & Sons, 1982.
- Litman GW: Physical properties of immunoglobulins of lower species: A comparison with immunoglobulins of mammals, in Marchalonis JJ (ed): Comparative Immunology. Oxford, Blackwell Scientific, 1976, pp 239-256.
- Tomonaga S, et al: Two populations of immunoglobulin-forming cells in the skate, *Raja kenoi*: Their distribution and characterization. Dev Comp Immunol 8:803-812, 1984.
- Rykers GT, et al: The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). Immunology 41:91-97, 1980.
- McLeay DJ: Effects of cortisol and dexamethasone on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Gen Comp Endocrinol 21:441-450, 1973.
- Mainwaring G, Rowley AF: Separation of leucocytes from the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) using density gradient centrifugation and differential adhesion to glass coverslips. Cell Tissue Res 241:283290, 1985.
- Mainwaring G, Rowley AF: Studies on granulocyte heterogeneity in elasmobranchs, in Manning MJ, Tatner MF (eds): Fish Immunology. Orlando, FL, Academic Press, 1985, pp 57-69.
- Bielek E: Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). Cell Tissue Res 220:163-180, 1981.
- Genini P: The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio*). J Zool 204:509-520, 1984.
- Weinreb EL: Studies on the fine structure of teleost blood cells in peripheral blood. Anar Rec 147:219-238, 1963.
- Cannon MS, Mollenhauer HH, Eurell TE, et al: An ultrastructural study of the leucocytes of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J Morphol 164:1-23, 1980.
- Ellis AE: The leucocytes of fish: A review. J Fish Biol 11:453-491, 1977.
- Saunders DC: Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. Trans Am Microscop Soc 85:427-449, 1966.
- Finn JP, Nielsen NO: The inflammatory response of rainbow trout. J Fish Biol 3:463-478, 1971.
- Doolittle RF, Surgenor DM: Blood coagulation in fish. Am J Physiol 203:964-970, 1962.
- Burton CB, Murray SA: Effects of density on goldfish blood-I. Hematology. Comp Biochem Physiol 62A:555-558, 1979.
- Haws GT, Goodnight CJ: Some aspects of the hematology of two species of catfish in relation to their habitats. Physiol Zool 35(1):817, 1962.
- Kamra SK: Effect of starvation and refeeding on some liver and blood constituents of Atlantic cod. J Fish Res Board Can 23(7):975-982, 1966.
- Sano T: Hematological studies of the culture fishes in Japan. J Tokyo Univ Fish 46:68-87, 1960.
- Summerfelt RC: Measurement of some hematological characteristics of goldfish. Prog Fish Cult 29(10):13-20, 1967.
- Larsen HN, Snieszko SF: Comparison of various methods of determination of hemoglobin in trout blood. Prog Fish Cult 23:8-17, 1961.
- Natt MP, Herrick CA: A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. Poultry Sci 31:735-738, 1952.
- Blaxhall PC, Daisley KW: Routine hematological methods for use with fish blood. J Fish Biol 5:771-781, 1973.
- Shaw AE: A direct method for counting the leucocytes, thrombocytes, and erythrocytes of bird blood. J Pathol Bacteriol 32:833-835, 1930.
- Dacie JV, Lewis K: Practical Hematology ed 4. New York, Churchill Livingstone, 1968.
- Campbell TW: Avian Hematology and Cytology. Ames, IA, Iowa State University Press, 1988.