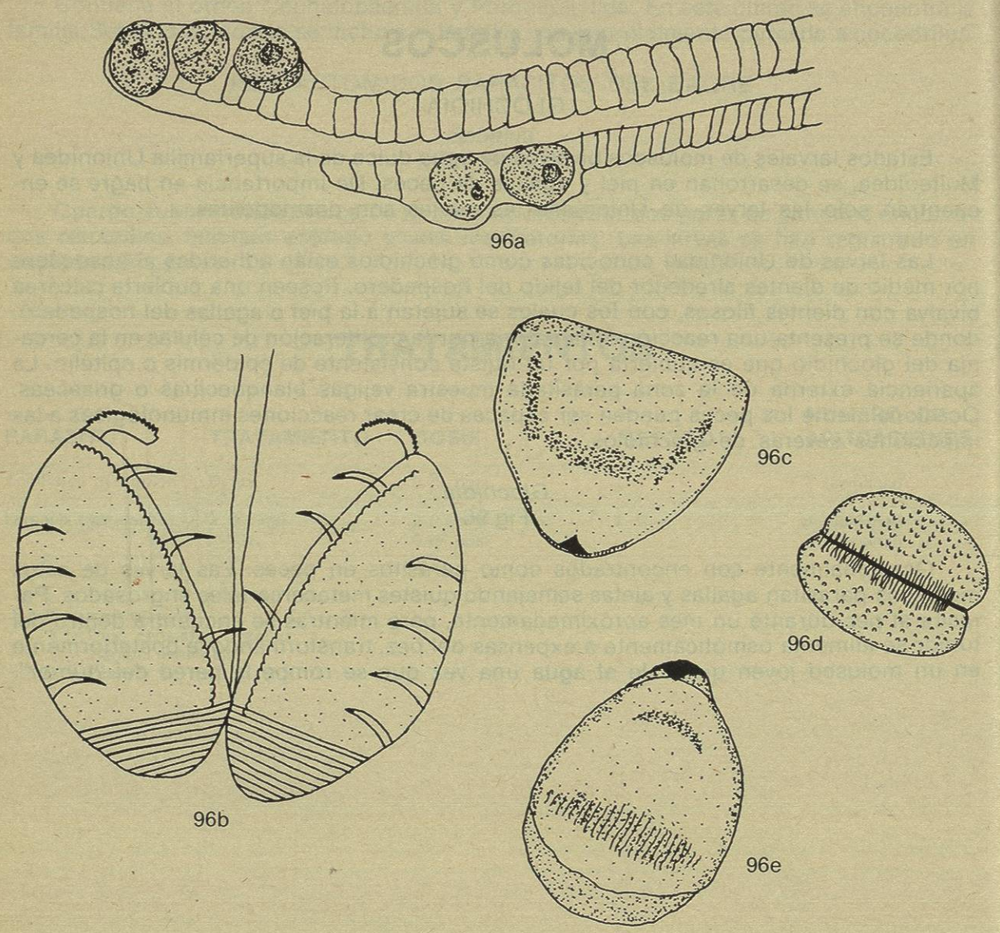

Fig. 96. *Glochidia;* Fig. 96a. Estadio larvario de *Glochidia;* 96b. Cubierta bivalva abierta mostrando los dientecillos o ganchos; 96c, d y e. Caparazón cerrado.

CAPÍTULO 9

ENVIO DE PECES AL LABORATORIO Y TECNICAS PARASITOSCOPICAS

El diagnóstico adecuado de las enfermedades que se presentan en peces, depende del piscicultor y de la persona encargada de hacer el diagnóstico; en primera instancia, el piscicultor debe ser capaz de reconocer los peces afectados para realizar el muestreo representativo, preparándolos adecuadamente para enviarlos al laboratorio y asegurarse de que los peces sean procesados en cuanto lleguen. Los peces enfermos o moribundos deben ser tomados alrededor de los bordes del estanque antes de la aplicación de cualquier tratamiento.

Una muestra representativa comprende de 3 a 10 peces que muestren signos clínicos de la enfermedad. Si se sospecha de alguna intoxicación por pesticidas es recomendable no usar bolsas plásticas porque desprenden trazas de otros elementos que interferirían con el análisis, en este caso, pueden envolverse en papel aluminio y refrigerarse para su conservación.

Además, es necesario colectar muestras de agua para un análisis físico-químico en recipientes de vidrio de un litro de capacidad.

Las muestras deberán colectarse aproximadamente a 15 metros de distancia del afluente distribuidor, en contra de la corriente y a una profundidad de 20 centímetros de la superficie del estanque. Se recomienda analizarlas lo más pronto posible en un tiempo menor de 6 horas para obtener resultados satisfactorios. Durante el transporte, la muestra deberá conservarse a temperaturas entre 0-10°C.

Nota: El Laboratorio de Parasitología ofrece el servicio de diagnóstico de parasitoscópico a aquellas personas o Instituciones interesadas.

ENVIO DE MUESTRAS DE PECES AL LABORATORIO

A) Tanques abiertos con agua:

La precaución que se debe tener, es colocar la cantidad suficiente de peces y no sobrecargar el tanque, debido a que los peces enfermos disminuyen notablemente su capacidad para sobrevivir. Si se coloca un número pequeño de peces en el tanque y la distancia es corta, no será necesaria la aereación; pero si la distancia a recorrer por el vehículo es larga o si se transportan muchos peces, debe colocarse un aereador con agitadores, aire comprimido u oxígeno.

B) Bolsas plásticas:

Estas deben llenarse a 1/4 o 1/6 de su capacidad con agua libre de cloro y el resto con aire, o puede sustituirse por oxígeno para enviarlo por autobús, avión, etc. Este

método es el más adecuado y económico, pero debido a la poca cantidad de peces que caben en la bolsa, se deben seleccionar hospederos pequeños, ya que éstos tienen menos demanda de oxígeno que los de talla mayor y su efectividad aumenta si se coloca hielo por fuera de la bolsa, la cual deberá estar bien sellada.

C) En Hielo o Congelador:

En este caso, los peces se introducen en bolsas de plástico sin agua para evitar la pérdida de agentes infecciosos (principalmente protozoarios) localizados en la piel y se colocan sobre el hielo. Esta forma es útil cuando no es posible destinar peces vivos para el diagnóstico y la distancia en tiempo es corta. Si la distancia es grande puede utilizarse una doble bolsa plástica con la cantidad de agua suficiente para cubrir al pez; cerrar herméticamente y colocarla en el congelador toda la noche y después en una hielera para prolongar su conservación. El hielo no puede preservar al pez durante más de 24 horas, pero si se coloca en la hielera con 2-5 kilos de hielo seco (CO_2 sólido) éste puede mantenerlo congelado por más de 48 horas.

D) Preservativos químicos:

Este medio permite mantener por un tiempo prolongado a los peces que serán sometidos al análisis parasitológico (incluyendo bacterias). Un buen fijador que puede utilizarse para estos casos es el formaldehído al 10%, éste es recomendable cuando se requieren peces muertos y no se desea realizar un análisis bacteriológico. En este caso, los peces enteros o trozos de tejido se introducen al líquido fijador tan pronto como sea posible. Debe utilizarse cinco veces o más del volumen del fijador en comparación con el volumen del tejido y mantenerse así por un lapso mínimo de 24 horas para posteriormente preservarse en formol al 5%.

Los datos que deben acompañar a los peces seleccionados para el examen son: edad, sexo, nombre científico del pez, tratamiento al que haya sido expuesto con anterioridad, identificación y tipo de estanque o tanque, profundidad promedio, temperatura, calidad del agua y otras que se consideran necesarias.

TECNICAS PARASITOSCOPICAS*

Para la identificación de las diversas formas parasitarias es necesario procesar debidamente el material infectado utilizando las técnicas que se incluyen en el diagnóstico de certeza o de laboratorio, éste comprende el examen macroscópico (con pequeños aumentos) y el examen microscópico que se logra mediante preparaciones directas permanentes y métodos de enriquecimiento.

a) Preparaciones directas: Incluye microscopia con contraste de fases, fluorescencia, campo claro u obscuro examinándose el material en fresco o con tinciones vitales.

b) Preparaciones permanentes: El diagnóstico con este método se aplica en **in prontas** de vísceras, gota gruesa, frotis de heces o directamente sobre protozoarios, helmintos o bacterias y utiliza básicamente microscopia de campo claro.

* Ver capítulo 12.

c) Métodos de enriquecimiento: Estos pueden ser mecánicos (soluciones de alta o baja densidad para heces fecales) o biológicos (coprocultivos, fototropismo, xenocultivos) mediante cultivos de sangre, heces, exudados, etc.

En cuanto se obtenga el ejemplar con sospechas de parásitos, debe examinarse visualmente (examen macroscópico) piel, aletas, branquias y boca en búsqueda de quistes, coloración anormal, hemorragias externas, secreción excesiva de mucus o pústulas de las cuales se toma una muestra y se observa bajo el microscopio.

En seguida se disecta, separando y colocando cada uno de los órganos en solución salina, para ser examinados macroscópicamente, incluyendo la cavidad celómica.

La identificación definitiva se realiza con la ayuda de técnicas de fijación, tinción y transparentación para lograr preparaciones permanentes.

Flagelados

Los flagelados intestinales pueden observarse vivos en preparaciones directas de la siguiente manera:

1. Colocar una gota de solución salina fisiológica (0.65%) en un portaobjetos.
2. Depositar sobre ésta una pequeña cantidad de la muestra con un aplicador y resuspender.
3. Colocar un cubreobjetos.
4. Observar al microscopio en seco fuerte.

Para la realización de preparaciones permanentes de los flagelados se hacen frotis de la superficie externa de la piel del pez o del contenido intestinal y se tiñen con Hematoxilina Férrica, Colorante Tricrómico de Gomori o Giemsa.

El procedimiento para la Técnica Tricrómica es la siguiente:

1. Fijar en Schaudinn por 1 hr a temperatura ambiente o 5 min a 50 grados centígrados en baño María.
2. Alcohol al 70% yodado (1 min).
3. Alcohol al 70% (1 min).
4. Alcohol al 70% (1 min).
5. Colorante tricrómico (2-8 min).
6. Alcohol al 90% acidificado (5-20 seg).
7. Alcohol 95% (1 min).
8. Alcohol 100% (1 min).

9. Carboxilol (1 min).

10. Xilol (5-15 min).

11. Montar en resina sintética neutra.

La tinción con Giemsa se realiza de la siguiente forma:

1. Hacer un frotis extendido sobre un portaobjetos.

2. Fijar con metanol (3 min).

3. Sumergir en el colorante de Giemsa (30-45 min).

4. Agregar buffer de Giemsa (agua de la llave con unas 5 gotas de colorante, debe tomar un color azul).

5. Lavar en agua de la llave. Dejar secar y examinar.

Sarcodinos

Una vez detectados en las heces fecales por observación directa (con lugol o solución salina), se procesan siguiendo las técnicas de Hematoxilina Férrica o Tricrómica de Gomori.

Técnica de Hematoxilina Férrica:

1. Después de fijar en Schaudinn y lavar en alcohol yodado (1 min) y alcohol etílico 70%.

2. Enjuagar en agua tres veces.

3. Pasar a solución mordiente (sulfato férrico amoniacal al 4%) a 56°C por 15 minutos en baño María.

4. Enjuagar en agua.

5. Introducir en Hematoxilina Férrica de Heidenhain (5-10 minutos).

6. Enjuagar en agua corriente.

7. Decolorar en solución sulfato férrico amoniacal al 0.25% (10 min). (Observar al microscopio la diferenciación de las estructuras.)

8. Lavar en agua corriente.

9. Deshidratar en alcohol 70, 80, 90 y 100% (5 min), introducir en carboxilol (1 min) y xilol (15 min) respectivamente para montar en resina sintética.

Microsporidios y Coccidios

1. Preparar frotis en portaobjetos de los quistes, tomando en cuenta que su localización en el pez es importante para su clasificación.

2. Fijar con alcohol sublimado.

3. Teñir con Hematoxilina Férrica.

Otra manera:

1. Dejar secar el frotis.

2. Fijar con metanol.

3. Teñir con el Colorante de Giemsa.

Myxosporidios

De los quistes localizados en piel y agallas:

1. Comprimir entre portaobjetos y cubreobjetos para observar el tamaño, forma del quiste y cápsulas polares. Examinar el material en fresco con un microscopio.

2. Fijar otros frotis en metanol.

3. Teñir con azul de metileno. Determinar el tiempo de tinción mediante pruebas.

4. Lavar con agua.

5. Deshidratar gradualmente en alcohol etílico 70, 80, 90 y 100% (3 min en c/u).

6. Transparentar en xilol (3-5 min).

7. Montar en resina sintética o bálsamo de Canadá.

Las cápsulas polares se tiñen azul obscuro y las esporas aparecen sobre un azul claro. Las vacuolas yodofílicas se tiñen de café si el frotis se realiza sobre una gota de lugol.

Si se desea, puede fijar el material con o sin una muestra de tejido en formol al 10% o alcohol 80%.

También puede teñirse con Giemsa o Hematoxilina.

Ciliados

1. Fijar el frotis de tejido o branquias en alcohol sublimado, procurando eliminar los restos de tejido.

2. Teñir con Hematoxilina de la Fiel o de Heidenhain. Determinar el tiempo de tinción.

3. Lavar con agua destilada hasta que adquiera un color azul.

4. Si la preparación está sobreteñida, decolorar con alumbre férrico y lavar con agua destilada.