

PENTASTOMIDOS PARASITOS DEL SACO

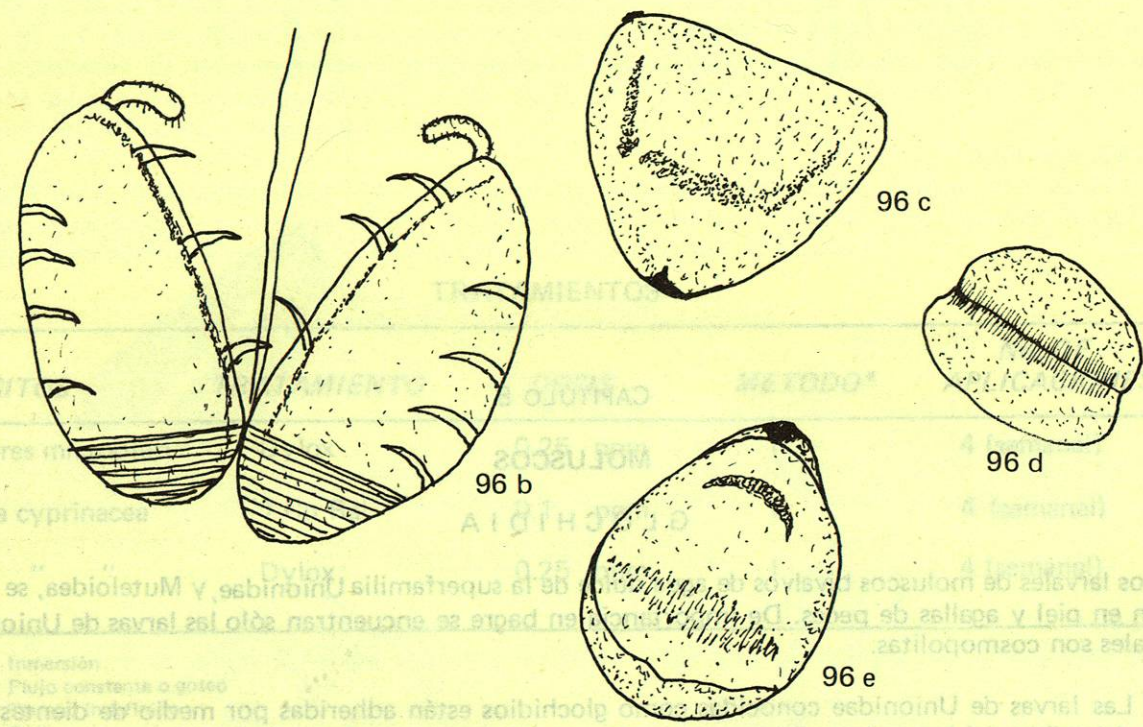
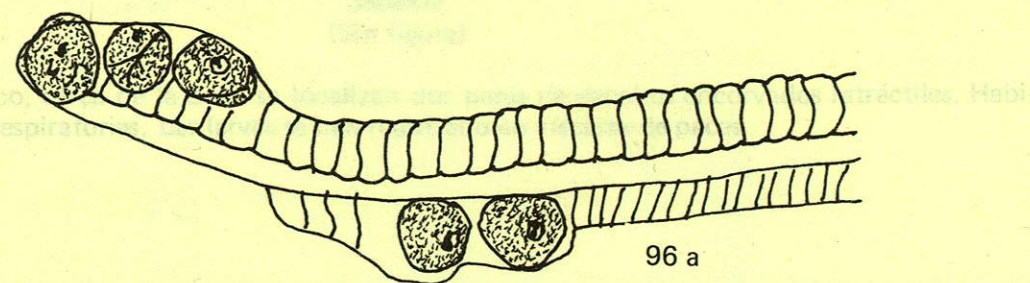


Fig. 96: *Glochidia*; 96a. Estadio larvario de *Glochidia*; 96b. Cubierta bivalva abierta mostrando los dientecillos o ganchos; 96c, d y e. Caparazón cerrado.

En cuanto se obtenga el material de estudio de peces, se debe proceder a su clasificación definitiva y a su conservación en alcohol o en hielo. En este caso, los peces se introducen en bolsas de plástico sin agua para evitar la pérdida de agentes infecciosos (principalmente protozoos) localizados en la piel y se colocan sobre el hielo. Este material se debe conservar en el laboratorio y se debe utilizar para el diagnóstico y la investigación de las enfermedades de los peces. Si la distancia es grande puede utilizarse una doble bolsa plástica con la cantidad de agua suficiente para cubrir el pez y colocarlo en el congelador toda la noche y después en una heladera para prolongar su conservación. El hielo no puede preservarse el pez durante más de 24 horas y para su conservación se debe utilizar hielo seco (CO₂ sólido) que puede mantenerlo congelado por más de 48 horas.

CAPITULO 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, prepararlos adecuadamente para enviarlos al laboratorio y asegurarse 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 tres a 10 peces que muestren signos clínicos de la enfermedad y si se sospecha de alguna intoxicación por pesticidas es recomendable no usar bolsas plásticas porque desprenden trazas de otros elementos que interfieren con el análisis, en este caso, pueden envolverse en papel aluminio y conservarlos en hielo o en un congelador.

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

Las muestras deberán coleccionarse 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 seis horas para obtener resultados satisfactorios. Durante el transporte, la muestra deberá conservarse a temperaturas entre 0-10°C.

ENVIO DE MUESTRAS DE PECES AL LABORATORIO

- A) Tanques abiertos con agua: El diagnóstico con este método es el más sencillo y utiliza tanques de agua o directamente sobre protozoos, helmintos o bacterias y utiliza la precaución que se debe tener es colocar la cantidad suficiente de peces y no sobrecargar el tanque, pues 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, entonces debe colocarse un aereador con agitadores, aire comprimido u oxígeno.

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

B) Bolsas plásticas:

Esta debe 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, pues estos 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 (CO₂ sólido) este 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 por ciento, este 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 cinco por ciento.

Los datos que deben acompañar a los peces seleccionados para el exámen 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 y calidad del agua y otras que se consideren 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 exámen macroscópico (con pequeños aumentos) y el exámen microscópico que se logra mediante preparaciones directas permanentes y métodos de enriquecimiento.

a) Preparaciones directas: Incluye microscopía con contraste de fases, fluorescencia, campo claro u oscuro 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 microscopía de campo claro.

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.

* Ver capítulo 12.

En cuanto se obtenga el ejemplar con sospechas de parásitos, debe examinarse visualmente (exámen macroscópico) piel, aletas, branquias y boca en busca 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 en solución salina con cuidado cada uno de los órganos, los cuales son 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 por ciento) en un portaobjetos.
2. Depositar sobre esta 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 una hr. a temperatura ambiente o cinco minutos a 50 grados centígrados en baño maría.
2. Alcohol al 70 por ciento yodado (un minuto).
3. Alcohol al 70 por ciento (un minuto).
4. Alcohol al 70 por ciento (un minuto).
5. Colorante tricrómico (2-8 minutos).
6. Alcohol al 90 por ciento acidificado (5-20 segundos).
7. Alcohol 95 por ciento (un minuto).
8. Alcohol 100 por ciento (un minuto).
9. Carboxilol (un minuto).
10. Xilol (5-15 minutos).
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 (tres minutos).
3. Sumergir en el colorante de Giemsa (30-45 minutos).
4. Agregar buffer de Giemsa (agua de la llave con unas cinco 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 (un minuto) y alcohol etílico 70 por ciento.
2. Enjuagar en agua tres veces.
3. Pasar a solución mordiente (sulfato férrico amoniacal al 4 por ciento) 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 por ciento (10 minutos), (observar al microscopio la diferenciación de las estructuras).
8. Lavar en agua corriente.
9. Deshidratar en alcohol 70, 80, 90 y 100 por ciento (cinco minutos), introducir en carboxilol (un minuto) y xilol (15 minutos) 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 tamaño y forma del quiste y cápsulas polares. Examinar el material en fresco con un microscopio.
2. Fijar otros frotis en metanol.
3. Teñir en 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 por ciento (tres minutos en c/u).
6. Transparentar en xilol (tres-cinco minutos).
7. Montar en resina sintética o bálsamo de Canadá.

Las cápsulas polares se tiñen azul oscuro 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 por ciento o alcohol 80 por ciento. 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 Field 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.
5. Deshidratar en etanol 70, 80, 90 y 100 por ciento (tres minutos en cada uno).
6. Transparentar en xilol (tres-cinco minutos).
7. Montar en resina sintética o bálsamo de Canadá.

Impregnación con Plata: Es útil para determinar la infraciliatura de los ciliados e identificarlos para lo cual:

1. Secar el frotis rápidamente al aire.
2. Introducir en una solución de nitrato de plata al 12 por ciento durante 5-10 minutos.
3. Lavar con agua destilada o irradiar con luz UV por 5-10 minutos o exponerlos a la luz solar por varias horas.
4. Examinar la preparación al microscopio cuando tiene un color oscuro.

Tremátodos Monogéneos

Estos se identifican básicamente examinando los ganchos marginales, anclas del opisthaptor y los órganos reproductores.

1. Colocar el tremátodo entre un portaobjetos y cubreobjetos.
2. Fijar con una mezcla de glicerina-alcohol.
3. Dejar evaporar el alcohol.
4. Eliminar las burbujas de aire, agregando gotas de glicerina entre el portaobjetos y el cubreobjetos.
5. Limpiar el portaobjetos alrededor del cubreobjetos.
6. Sellar con laca, esmalte para uñas o negro de asfalto manteniendo la preparación en posición horizontal.

Tremátodos Digéneos, Céstodos y Acantocéfalos

Los tremátodos y céstodos se introducen en un tubo de ensaye con agua o solución salina fisiológica y se agitan. Luego se comprimen entre dos portaobjetos y si son muy pequeños entre portaobjetos y cubreobjetos.

Para fijar los acantocéfalos, estos deben tener la probóscide fuera del tronco, esto se logra colocándolos en agua destilada por una hora aproximadamente, antes de colocarlos entre dos portaobjetos. Los tremátodos, céstodos y acantocéfalos se fijan y se tiñen de manera similar.

Fijación:

1. Colocarlos entre dos portaobjetos o entre portaobjetos y cubreobjetos, dependiendo del tamaño. Introducir las laminillas en A F A (alcohol-formol-ácido acético) de 2-24 horas.
2. Sumergirlos en etanol al 70 por ciento por varias horas para eliminar el fijador, o bien pueden preservarse en esta solución.

La tinción se realiza con Carmín Alumbre, Carmín Borax o Hematoxilina de De la Field.

Tinción con Carmín Alumbre:

1. Lavar en agua destilada por 10 minutos en cajas Petri.
2. Introducir al colorante por 5-60 minutos, según el tamaño.
3. Lavar en agua destilada.
4. Transferir a etanol 70, 80, 90 y 100 por ciento para deshidratar durante tres-cinco minutos en cada alcohol.
5. Transparentar en xilol o salicilato de metilo, colocando el ejemplar de 30 minutos a dos horas.
6. Montar en resina sintética.

Tinción con Carmín Borax:

1. Del etanol 70 por ciento, transferir al colorante durante varias horas, en cajas de petri.
2. Si se sobretiñe, introducirlos en etanol acidulado (99 ml. de etanol 70 por ciento y un ml. de ácido clorhídrico), se observa al estereoscopio para sacarlos al momento en que ya se hayan diferenciado las estructuras.
3. Lavar en etanol 70 por ciento.
4. Deshidratar en etanol, transparentar en salicilato de metilo y montar, igual que en la técnica anterior.

Tinción con Hematoxilina de Van Cleave:

1. Transferirlos a una caja Petri con agua destilada. Lavarlos cuatro veces en agua destilada por cinco minutos para eliminar el fijador.
2. Introducirlos a la Hematoxilina de Van Cleave 30-40 minutos.
3. Sumergirlos en agua destilada y checar el tono de la tinción al estereoscopio. Si están sobretiñidos, sumergirlos en agua acidulada (ácido clorhídrico al uno por ciento) y esperar la diferenciación de las estructuras observándolos al estereoscopio; pasarlos a agua destilada. Si la tinción es muy tenue, regresarlos a la Hematoxilina.
4. Una vez diferenciados, transferirlos a agua carbonatada (carbonato de litio a saturación en agua destilada).
5. Lavar el exceso de carbonatos en agua destilada.
6. Deshidratar en etanol 70, 80, 90 y 100 por ciento; cinco minutos en cada uno.
7. Transparentar en xilol o salicilato de metilo por dos horas.
8. Montar en resina sintética.

Nemátodos

Fijación:

1. Lavar en solución salina fisiológica.
2. Introducirlos en agua caliente (hervir y dejar serenar) y sacarlos inmediatamente.
3. Fijar en Formol 5-10 por ciento en AFA durante 2-24 horas.
4. Preservar en etanol al 70 por ciento.

Transparentación en Glicerina:

1. Del etanol 70 por ciento, donde pueden preservarse durante varias horas o días, se transfieren sucesivamente a la glicerina al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 por ciento; dejándolo en cada una de 30 minutos a dos horas a 40°C.

2. Montar en Glicerina gelatina, sellando la preparación semipermanente con negro de asfalto o esmalte de uñas.

Transparentación en Lactofenol:

1. Del etanol al 70 por ciento, transferir a lactofenol durante varias horas.
2. Examinar entonces, si se desea, colocándolos entre un porta y cubreobjetos agregando Lactofenol.

Sanguijuelas

1. Fijar en Formol 2 por ciento. En esta solución conservan su pigmentación, pero pueden preverse en etanol 70 por ciento.
2. Examinar con una lupa o con estereoscopio.
3. Preservar en etanol al 70 por ciento.

Crustáceos

1. Fijar igual que las sanguijuelas.
2. Transparentar en glicerina.
3. Montar en glicerina gelatina (igual que los nemátodos).

REACTIVOS

Fijadores

- 1). Alcohol sublimado:

Etanol absoluto	70.0 ml.
Agua destilada	30.0 ml.

Para usarse: Calentar hasta que aparezcan vapores de alcohol a 60°C, colocar la laminilla boca abajo en una cubeta o caja Petri y dejarla en contacto con los vapores por 15-20 minutos.

- 2). AFA (Alcohol-Formol-Acido acético):

Formol 37-40 por ciento	10.0 ml.
Etanol 95 por ciento	25.0 ml.
Glicerina	10.0 ml.
Agua Destilada	50.0 ml.
*Acido acético	5.0 ml.

* Agregar antes de usarse.

- 3). Metanol:

Utilizar de preferencia este alcohol al 100 por ciento y libre de acetona. Se sumergen las laminillas durante tres-cinco minutos.

- 4). Schaudinn:

Etanol al 95 por ciento	1 vol.
Solución acuosa saturada de bicloruro de mercurio	2 vol.

Antes de usarse, agregar cinco ml. de ácido acético por cada 100 ml. de solución. Deben de utilizarse canastillas y pinzas de plástico, pues el material de fierro inactiva el fijador.

- 5). Formol 10 por ciento:

Formol comercial (37-40 por ciento)	10.0 ml.
Agua destilada	90.0 ml.

- 6). Formol dos por ciento

Formol comercial (37-40 por ciento)	2.0 ml.
Agua destilada	98.0 ml.

Colorantes

- 7). Hematoxilina Férrica de Heidenhein (solución madre):

Hematoxilina en cristales	10.0 gr.
Etanol 95 por ciento	100 ml.

Preparación de la solución de trabajo:

- | | |
|-------------------------------|----------|
| Hematoxilina (solución madre) | 10.0 ml. |
| Agua destilada | 90.0 ml. |

Se disuelve la hematoxilina en una pequeña cantidad de alcohol, luego se agrega el resto. Dejar madurar seis semanas.

- 8). Azul de metileno:

Azul de metileno (polvo)	3.5 gr.
Agua destilada	100 ml.

Añadir el colorante y agitar cuidadosamente. Dejar reposar unas horas. Filtrar y conservar en frasco con tapón de rosca.