

Se harán frotis de contenido rectal y ciegos pilóricos de la trucha para ser examinados bajo un microscopio de luz. Los frotis serán fijados en líquido de Bouin Hollande por 20-25 min. seguido de impregnación en protargol, usando plata proteinada (Aldrich chemical Co. WI, USA) para observar forma y tamaño del cuerpo, núcleo y flagelados.

Cortes histológicos serán preparados de piezas fijadas del recto o región pilórica en formalina 10%, deshidratar en etanol, aclarar en xilol y embeber en parafina. Cortes función cortadas en 4-6 min. y teñidos en Hematoxilina de Harris y Eosina ó Reacción Feulgen. Las muestras también serán fijadas en glutaraldehído 5% y para formaldehído 4% en buffer de fosfatos 0.1 m. para confirmar la presencia de parásitos al microscopio electrónico.

## Criptobiasis

### (*Cryptobia salmositica*)

Organismo biflagelado, parecido a un trypanosoma, tiene un flagelo libre, membrana ondulante y blefaroplasto elongado. Habitan intestino y sistema sanguíneo de las truchas. El agente causal es *Cryptobia salmositica*. Mide de 12-24 micras de largo por 4-8 micras de ancho. Los hospederos intermediarios son las sanguijuelas. La patogenicidad no ha sido bien estudiada. Causa anemia, exoftalmia y presencia de fluido ascítico en cavidad abdominal.

Los métodos de diagnóstico de *Cryptobia* incluyen realizar frotis sanguíneos los cuales se procesaran con la técnica de Giemsa. Además se podrá realizar el siguiente método para mantener a este parásito.

### CULTIVO AXENICO DE *Cryptobia* (Daggett & Nerad, 1992)

#### Medio Difásico de Agar sangre

extracto de res (en polvo)	25g
neopeptona	10g
NaCl	2.5g
Agar	10g
Agua destilada	250ml

- 1) Añada 25g de extracto de res al agua destilada, caliente 3-5min, agitando constantemente.
- 2) Filtre con papel Whatmann # 2V, ajuste a pH 7.2-7.4 con NaOH 1N
- 3) Pasar a autoclave por 20 minutos a 121 grados centígrados
- 4) Enfriar a 50 grados a baño de agua por 30 minutos y asepticamente anada sangre de conejo defibrinada al 30%.
- 5) Prepare 5 ml en un tubo de 16 X 125 mm, incline y enfrie.
- 6) Anada asepticamente 3.0 ml de Solución Lucke's esteril.

#### Solución de Locke's

NaCl	8g
KCl	0.2g
CaCl <sub>2</sub>	0.2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3g
Glucosa	2.5g
Agua destilada	1000ml

- 7) Inocule con 0.1 ml del cultivo en crecimiento
- 8) cierre la tapa e incube a 25 grados centígrados
- 9) Por rutina mantenga semanalmente subcultivos.

## Chilodonelosis.

*Chilodenella truttae* y *Ch. cyprini* son comunes de encontrar en piel y branquias de truchas de Norteamérica y Europa. Es usualmente patógeno únicamente a temperaturas bajas (10°C). Este ciliado es ovoide y dorsoventralmente aplanado. Mide 50-70 mm de largo por 30-40 mm de ancho. La ciliatura es incompleta. La superficie ventral tiene de 8-15 hileras de cilios macronúcleo oval. Reproducción por división simple. La transmisión es por contacto directo con el organismo en el agua. Se dividen rápidamente a 5-1008°C. *Ch. cyprini* es un ectoparásito obligado de peces sin especificidad de hospederos. Ocurre en piel y branquias pero no penetra la epidermis. Causa irritación, hiperplasia epitelial y excesiva producción de mucus. Las branquias son usualmente las más dañadas que el resto del cuerpo. Infecciones severas causan problemas en la respiración templadas. Se encuentra ampliamente distribuido en zonas en la pérdida de peso, apetito y letargo y opacidad en la piel. Es necesaria la identificación del parásito de raspados de piel y branquias para un adecuado diagnóstico. Mas de 50 Chilodonellas observadas por campo bajo el microscopio sugieren una infestación severa que deberá tratarse inmediatamente.

## Trichodiniasis

Los generos *Trichodina* y *tripartiella* son ucelaridos que atacan a la trucha, particularmente *Trichodina fultoni* (syn. *T. pediculus*) atacan *Salmo gairdneri*. Estos ciliados tienen forma de barril, un disco adhesivo, zona de cilios en la zona adoral y un anillo esquelético dorsoventral constituido por dientes radiales.

Los generos *Trichodina* y *Tripartiella* se diferencian en la extensión del spiral de cilios, forma y tamaño de los dientes. *Trichodina* tiene un espiral de cilios que da dos vueltas a la celula y los dientes tiene un proceso interno poco desarrollado. *Tripartiella*, tiene un espiral que da una vuelta a la celula y un proceso interno del diente mas largo que en *Trichodina*. Las infecciones en truchas probablemente tengan un efecto patológico, pero las infecciones mas severas ocasionan daños a la piel, producción de mucus, pérdida de escamas, hiperplasia, anorexia, aletas deshinchadas.

## Icthyophthiriasis (*Icthyophthirius multifiliis*)

Este ciliado causa la enfermedad denominada de las "manchas blancas". Ataca principalmente piel y branquias de diversas especies de truchas. *I. multifiliis* es el protozoo de mayor tamaño que afecta peces. Los adultos llamados trofozoitos o trofontes son de forma oval o redondeada. Miden de 50 micras a 1 milímetro de diametro. Tienen un citostoma cerca del extremo anterior y un macronúcleo en forma de herradura. Los estadios infectivos llamados terontes o tomites son de forma oval, miden de 30-45 micras. Esta forma secreta una capa mucosa o quística, se divide por división transversal simple o múltiple y el quiste puede contener varios cientos de tomites.

Su ciclo vital es completado en 7-8 horas a temperaturas de 24-26°C. A los 7°C el ciclo tarda en completarse cerca de 40 días. Las infecciones en truchas son principalmente por contacto directo con otras truchas infectadas. Los trofontes o quistes pueden ser transferidos por las plantas acuáticas o por otros vectores. La penetración del parásito en la piel y branquias causa irritación. La epidermis del pez reacciona fisiológicamente con irritación encerrando el parásito y produciendo las típicas lesiones granulomatosas de color blanquecino "black spot".

Las truchas afectadas presentan letargo, anemia y en casos severos se presentan mortalidades. Es notorio que los peces afectados nadan hacia los lados del estanque, particularmente hacia donde existen altas concentraciones de oxígeno como son las entradas del agua de los estanques. El diagnóstico se basa en la observación de las lesiones típicas e identificación del parásito (p.e. presencia de macronúcleo en forma de herradura, ciliatura uniforme de todo el cuerpo y citostoma presente).

Las técnicas de diagnóstico de *Trichodina*, *Ichthyophthirius* y *Chilodonella* se describen a continuación

#### PROTARGOL (WICKLOW & HILL, 1982)

Esta técnica es usada en estudio morfostáticos y morfológicos de protistas, particularmente flagelados, y ciliados. Este método dura aproximadamente 2-3 horas.

#### Pasos:

- 1) Se colectan los flagelados del contenido intestinal de las truchas.
- 2) Los organismos son fijados en la solución de Perenyi's  
Solución de Perenyi's  
Ácido crómico 1% (1.5ml), Ácido nítrico 10% (4.0 ml), etanol 95% (3.0ml) y agua destilada (1.5ml).
- 3) Lavar y deshidratar; resuspender las células en tres cambios de etanol 95% y luego en etanol 100%.
- 4) Montaje: Agregar una gota con los organismos a un cubreobjetos albuminizado, dejar que el vapor se evapore, teniendo cuidado que la muestra no se seque, agregue una gota de alcohol-formol.  
alcohol-formol  
formaldehído acuoso 10%    3 partes  
etanol 95%                    1 parte
- 5) Estabilizar: Poner el portaobjetos en cajas de vidrio con alcohol-formol por 15 minutos.
- 6) Deshidratar: Usar isopropanol al 95%, luego 100% por 2 minutos en cada paso y luego en metanol 100% por 3 minutos.
- 7) Cubrir con solución Colloidon: Bañe brevemente la muestra en Colloidon 1% y metanol 100% por 1-2 segundos; secar al aire (5-10 segundos).
- 8) Hidratar: en isopropanol (95%, 70%, 30% por 2 minutos) y pasar 3 veces a agua destilada por 2 minutos en cada paso.
- 9) Oxidar en óxido de manganeso 0.5% por 3 minutos.
- 10) Lavar tres veces en agua destilada por 3 minutos en cada paso.
- 11) Decolorar en ácido oxálico 5% por 5 minutos.
- 12) Lavar varias veces en agua destilada por 10 minutos para remover todo el ácido oxálico.
- 13) Impregnación en protargol al 1% por 20 minutos a 70°C.
- 14) Revelado: Transfiera directamente el revelador (hidroquinona 1%, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 5%) por 3-5 segundos. Cuando note las estructuras morfológicas del flagelado oscurecidas o ensombrecidas, pasar a agua destilada por 2 minutos.
- 15) Reducir en ácido oxálico 2% por 2-5 minutos.
- 16) Lavar en agua destilada por 2 minutos.
- 17) Fijar en tiosulfato de sodio 5% por 5 minutos, lavar en agua destilada por 2 minutos.

- 18) Deshidratar en isopropanol 30%, 70%, 95%, 100% 2 veces, 2 minutos en cada paso, luego en metanol 100% por 3 minutos.
19. Observe la muestra y transfiera a medio de montaje Permount

#### METODO DE NITRATO DE PLATA (FOISSNER, 1992)

#### "Desecación"

Este método es llamado en seco porque las células son secadas al aire y no fijadas químicamente después de haber sido tratadas con nitrato de plata, es útil para observar la infraciliatura oral y somática necesaria la adecuada identificación de ciliados de truchas.

- 1) Tomar varios portaobjetos libres de grasa y poner una capa fina de albumina de huevo en la mitad del portaobjetos, secar un minuto.
- 2) Colocar una gota conteniendo los ciliados en el portaobjetos albuminizado.
- 3) Aplicar 2-5 gotas de nitrato de plata al portaobjetos y esperar un lapso de 2 minutos.
- 4) Lavar los portaobjetos con agua destilada por 3 segundos.
- 5) Prevelar la laminilla secada por exposición a un bulbo eléctrico de 40-60 watts por 5-60 segundos a una distancia de 3-10 centímetros.
- 6) Aplicar gotas del revelador a la laminilla secada por espacio de 30-60 segundos.
- 7) Vacíe el revelador lejos de la laminilla, lave poco a poco a chorro de agua por espacio de 50-10 segundos y sumerja en fijador tiosulfato de sodio.
- 8) Remueva la laminilla del fijador, lave poco a poco a chorro de agua por 5-10 segundos y sumerja en etanol 96-100%.
- 9) Transfiera las laminillas a etanol 100% por 3 minutos y dejar secar al aire.
- 10) Montar en medio sintético neutro como Medio Eukitt o Euparal.

#### REACTIVOS

##### A) SOLUCION DE NITRATO DE PLATA

Nitrato de plata	1g.
Agua destilada	100 ml.

##### B) REVELADOR

Solución A	20ml
Solución B	1ml
Solución C	1ml

##### Solución A (concentrado revelador de negativos)

Agua de llave a 40°C	1000ml
Ácido bórico	10g
Borax	10g
Hidroquinona	5g
Sulfito de sodio anhidro	100g
metol=methylamino-fenol-sulfato	0.4g

##### Solución B (concentrado revelador de papel)

Agua destilada	100ml
metol	0.4g
sulfito de sodio anhidro	5.2g

hidroquinona	1,2g
Carbonato de sodio	10,4g
Carbonato de potasio	10,4g
Bromuro de potasio	0,4g

Solución C	
Hidroxido de sodio	10g
Agua destilada	100ml

C) Fijación por impregnación	
tiosulfato de sodio	25g
Agua destilada	1000ml

**METODO DE FEULGEN (LEE & PAWLOWSKI, 1992)**

- 1) Fijar las muestras en liquido de Bouin o Zenker.
- 2) Pasar las muestras a decoloracion en 0.1ml de 12NHCL; 0.4g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 100 ml de agua destilada.
- 3) Pasar al reactivo de Schiff. En este paso se seguira el siguiente procedimiento:
  - a) Hervir 200 ml de agua
  - b) pasar las muestras a fucsina básica
  - c) agitar y enfriar a 50 grados centigrados.
  - d) anada 1gramo de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Sila solucion no es aclarada, agregue 200mg de charcoal activado, agite por varios minutos. Guardar en el refrigerador.
- 4) Desparafine., embeba, corte y monte laminillas de los protozoarios
- 5) Lave en NHCL por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Hidrolize en NHCL por 15 minutos a 60 grados centigrados.
- 7) Lave en NHCL a temperatura ambiente
- 8) Lave en agua destilada
- 9) Tenir con el reactivo de Schiff por dos horas en la oscuridad
- 10) Desechar, oscurecer y transferir rápidamente dentro de la primera solución decoloradora.
- 11) Después de dos minutos, oscurecer y transferir rápidamente a una solución decoloradora nueva.
- 12) Repita el paso 11
- 13) Lavar en agua destilada
- 14) Deshidratar en una serie gradual de alcoholes hasta el 95%.
- 15) Pasar a tinción con verde rapido por 0.5-2 minutos (verde rápido FCF, C.I. 42053, 50 mg en etanol al 95%.
- 16) Deshidratar y montar en medio Permount.

**TECNICA ESTANDAR DE DIAGNOSTICO DE CILIADOS VIVOS (FOISSNER, 1992)**

Muchos medios físicos y químicos han sido usados para retardar el movimiento de ciliados (p.e. sulfato de niquel o metil celulosa). estos procedimientos se ha notado que ocasionan cambios en la forma de la célula y alteraciones premortales de carias estructuras celulares. Es mejor usar el siguiente método.

- 1) Colecte la muestra de ciliados previamente filtrada o separados de particulas y residuos de la muestra, con ayuda de un micropipeta y continúe con los pasos siguientes

- A) Aplicar en los cuatro extremos de un cubreobjetos respectivas gotas de vaselina.
- B) Transferir la muestra colectada a un portaobjetos libre de grasa
- C) Colocar el cubreobjetos sobre el portaobjetos
- D) Observar al microscopio

**TECNICA ESTANDAR DE TRICROMICA DE GOMORI (TINCION DE Trichodina spp.)**

- 1) Fijar en Schaudinn por 1 hora a temperatura ambiente o cinco minutos a 50 grados centigrados en baño maria.
- 2) Pasar OH 70% Iodado por un minuto
- 3) Pasar OH 70% dos veces, 1 minuto en cada paso.
- 4) Pasar al colorante Tricromico de 2-15 minutos
- 5) Pasar a alcohol 70% si la muestra quedo bien tenida. Si quedo **sobretenida** colocar estas en alcohol acidificado por un lapso de 5-20 segundos.
- 6) Deshidratar si la muestra esta bien en alcohol 80,90 y 100%.
- 7) Colocar las muestras en Carboxilo por 1-5 minutos
- 8) Aclarar en xilol o salicilato de metilo
- 9) Montar en resina sintetica neutra.

\* NOTA; El macronucleo de los urcelaridos e tine de color rojo y el citoplasma y anillo denticulado de color verde.

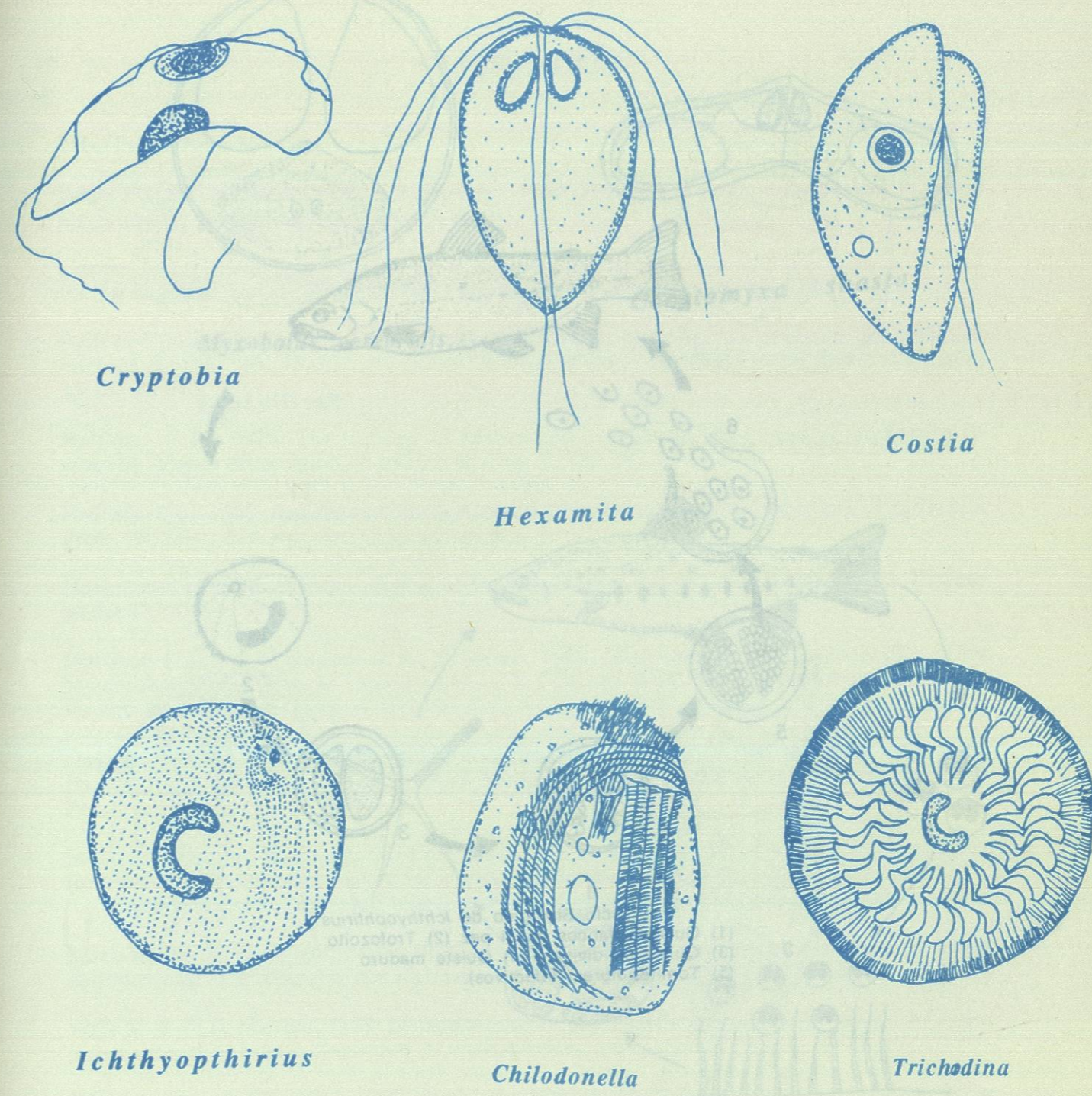
**TECNICA ESTANDAR DE TINCION DE GIEMSA (PARA MYXOSPOREOS Y MICROSPOREOS)**

- 1) Hacer un frotis extendido sobre un portaobjetos de muestras obtenidas por centrifugacion o de tejidos u organos donde se sospeche la presencia de quistes color blanquecino.
- 2) Fijar en metanol absoluto por un lapso de 3 minutos
- 3) Tenir en colorante Giemsa por espacio de 15-30 minutos
- 4) Pasar a buffer de Giemsa por 15 minutos
- 5) Dejar secar y observar en objetivos 40X,43X, 63X o 100X.
- 6) Si la muestra esta bien tenida y son visibles las capsulas polares que se teniran de un color azul intenso, entonces se pasan las laminillas a xilol para su montaje en resina sintética neutra.

**TECNICA DE HEMATOXILINA DELAFIELD  
(PARA CILIADOS)**

- 1) Fijar las muestras en formalina 10%, particularmente de las esporas libres liberadas de los quistes o tomadas directamente de piel o branquias. Nota; Todo el proceso se hará por centrifugación de 1000-15000 revoluciones por minuto.
- 2) Lavar el fijador en agua destilada 3 minutos
- 3) Pasar las muestras a colorante delaField 5-10 minutos
- 4) Lavar en agua destilada hasta que las muestras adquieran un color azul.
- 5) Si esta sobretenida usar agua acidificada hasta que tengan su coloración normal, si esta bien la muestra, esta se pasa a agua carbonatada.
- 6) Se lava en agua destilada y posteriormente se deshidratan en una serie gradual de alcoholes 70-100%. por 5 minutos
- 7) Se pasan luego a carboxilol por 5 minutos y xilol por 5 minutos
- 8) Montar en resina sintética neutra

CABILLERA ALFONCINA



*Ciclo biológico de Myxobolus cerebralis*

- a. trucha infectada con esporas
- b. esporas liberadas del pez
- c. esporas comidas por un pez
- d. desarrollo con 3 esporas
- e. fase infectiva o Trichodinon

TECNICA ESTANDAR DE DIAGNOSTICO DE CILIADOS VIVOS

Si la muestra esta bien tenida y son visibles las capsulas por las que se fijaron en resina color azul intenso, entonces se pasan las laminitas a xilol para su montaje en resina sintetica neutra.

Muchos metodos y quimicos se han usado para fijar los ciliados (p.e. formalina, alcohol, niquel o metil celulosa), estos procedimientos se ha notado que ocasionan cambios en la forma de la célula y alteraciones premortales de varias estructuras celulares. Es mejor usar el siguiente metodo.

- 1) Colocar la muestra de ciliados previamente filtrada o separados de particulas y residuos de la muestra, con ayuda de un micropipeta y continúe con los pasos siguientes