

INSTITUTO NACIONAL DE PESCA

**MANUAL DE METODOS
PARASITOLOGICOS E
HISTOPATOLOGICOS
EN PISCICULTURA**

INFORME TECNICO N° 31

MAYO 1982

MONTEVIDEO — URUGUAY

/ 0031

MANUAL DE METODOS
PARASITOLOGICOS E
HISTOPATOLOGICOS EN PISCICULTURA

PREPARADO POR:

ALBERT KEIM

PROYECTO FAO/PNUD/URU/78/005
"ASISTENCIA AL INAPE"

M A Y O 1982

_____ MONTEVIDEO - URUGUAY _____

INDICE

	<u>Página</u>
AGRADECIMIENTOS	1
1. INTRODUCCION	2
2. METODOS PARASITOLOGICOS E HISTOPATOLOGICOS	4
2.1 Metodología para la detección de parásitos en peces	4
2.2 Examen de los parásitos vivos	6
2.3 Fijación de parásitos	7
2.3.1 Fijación de Protozoos	7
2.3.2 Fijación de Nematodos	8
2.3.3 Trematodos Monogenea	9
2.3.4 Trematodos Digenea, Céstodos y Acantocéfalos	10
2.3.5 Sanguijuelas (Hirudíneas)	10
2.3.6 Crustáceos	11
2.4 Agentes de fijación de uso común en ictioplanctología	11
2.4.1 Formol con Buffer de fosfato	11
2.4.2 Susa de Heidenhain	12
2.4.3 Líquido de Bouin	13
2.4.4 Líquido de Carnoy	13
2.4.5 Otros líquidos	14
2.4.6 Líquido de Gendre	15
2.5 Descalcificación	15
2.5.1 Descalcificación ácida	15
2.5.2 Método de quelación	16
2.5.3 Punto de descalcificación	16

	<u>Página</u>
2.6 Procesamiento de tejidos fijados	17
2.6.1 Deshidratación	18
2.6.2 Clarificación	18
2.6.3 Inclusión en parafina y endurecimiento	19
2.6.4 Corte	20
2.6.5 Desparafinado	20
2.6.6 Eliminación de las precipitaciones de mercurio	20
2.6.7 Tinción	21
2.6.8 Deshidratación	21
2.6.9 Inclusión	21
3. ORIGEN DEL MATERIAL	22
4. RESULTADOS PRELIMINARES	23
5. RECOMENDACIONES PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES EN PISCICULTURA	26
5.1 Medidas de prevención	26
5.2 Directivas a seguir en el tratamiento	26
5.3 Ichthyophthiriasis	28
5.4 Sugerencias de tratamientos para otras enfermedades	29
5.5 Reacciones inmunológicas	32
5.6 Recomendaciones finales	33
BIBLIOGRAFIA	34
Apéndice I - Hematoxilina de Hierro de Heidenhain	36
Apéndice II - Tinción con Giemsa para la demostración de parásitos en frotis de sangre (modificado de Wiesman 1978)	37

	<u>Página</u>
Apéndice III - Preparaciones de glicerol-gelatina (Bauer et al 1973)	38
Apéndice IV - Tinción de platelmintos con hematoxilina ácida de Ehrlich (Bullock 1978)	39
Apéndice V - Esquemas de procesamiento de tejidos en histopatología (modificado según Bullock 1978)	41
Apéndice VI - Fórmula de hematoxilina (Bullock 1978)	42
Apéndice VII - Tinción con hematoxilina y eosina para histología general	43
Apéndice VIII - Acido periódico de Schiff con tartracina en celulosa para la demostración de carbohidratos	44
Apéndice IX - Reactivo de Feulgen para la demostración de DNA	45
Apéndice X - Van Gieson	47
Apéndice XI - Tinción de Giemsa	48
Apéndice XII - Formulario para los resultados de disecciones de peces (modificado según Reichenbach-Klinke 1975)	49

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento por la ayuda invaluable recibida:

- A las autoridades del Instituto Nacional de Pesca (INAPE) y en especial al Dr. H. Nión, Director de la División de Biología Pesquera.
- Al Dr. Zoel Varela, Jefe del Depto. de Acuicultura y a su Ayudante, la Dra. Graciela Fabiano.
- Al personal de la Sección Química, especialmente al Sr. Gustavo Inocente y a la Q.P. Ruth González.
- Al Experto Principal del Proyecto de Asistencia al INAPE URU/78/005, Ing. Jorn Aagaard.
- A su colega, Experto Asociado Knud Fischer.
- A la Srta. María José Marán, quien escribió a máquina y tradujo este manual al español.

1. INTRODUCCION

Se presentan en este manual resultados preliminares sobre la parasitología del bagre negro (Rhamdia sapo) y recomendaciones para la prevención y control de enfermedades en el cultivo de esta especie.

En la cría de animales debe prestarse especial atención a las enfermedades, ya que estas son causantes de pérdidas y disminución de crecimiento.

En cultivos de piscicultura, los parásitos son responsables en un alto porcentaje de las enfermedades de los peces.

Recientes problemas provocados por epidemias de infecciones de Ichthyophthirius multifiliis en la cría del bagre negro cultivado por el Departamento de Acuicultura del INAPE de Uruguay, y el conocimiento de que todos los piscicultores tienen problemas con los parásitos, constituyeron la base y antecedente para el inicio de un programa de investigaciones parasitológicas.

Este programa incluyó:

1. Disección de bagres capturados en Laguna del Sauce y colecta de parásitos.
2. Disección de bagres cultivados en el laboratorio y en los estanques de INAPE, y colecta de parásitos.
3. Identificación de los parásitos recolectados.
4. Elaboración de un manual que recopila los métodos más comúnmente utilizados en parasitología e histopatología en la piscicultura.

Este manual fue diseñado de forma de brindar entrenamiento al personal del Departamento de Acuicultura de INAPE. Además, se presentan los resultados de las investigaciones, y en el último capítulo se presta especial atención a las enfermedades observadas en el laboratorio y en los estanques de cultivo, brindando recomendaciones para la prevención y control de dichas enfermedades, en general y especialmente de ichthyophthiriasis.

2. METODOS PARASITOLOGICOS E HISTOPATOLOGICOS

El análisis de los especímenes y el examen histológico del material preparado deberá realizarse solamente sobre ejemplares recientemente muertos. Esto es de suma importancia para la detección de muchos protozoarios.

2.1 Metodología para la detección de parásitos en peces

La secuencia del examen es según Bullock 1978.

1. Haga un raspaje de piel, monte en un portaobjeto con agua o solución salina y examine en busca de protozoos y monogéneas pequeñas. Examine la superficie exterior, incluyendo las cavidades bucales y operculares, en busca de parásitos externos grandes.
2. Retire las branquias y examínelas individualmente bajo agua.
3. Retire los ojos y ábralos bajo agua; examine lentes, humor y retina.
4. Examine la cavidad corporal. Saque una o dos gotas de sangre del corazón y examínelas en un portaobjetos. Haga frotis teñidos.
5. Retire el intestino, el hígado y la vesícula biliar. Examine el contenido de la vesícula biliar en un portaobjetos. Corte el hígado, aplaste una porción y examínela.

6. Examine el exterior del intestino y córtelo en secciones. Abra cada sección desde la parte posterior y obsérvela bajo agua in situ por si existieran parásitos. Haga un frotis del contenido intestinal y examínelo.
7. Corte las gónadas y haga preparaciones aplastadas en un portaobjetos.
8. Abra la vejiga natatoria y examine contenido y paredes.
9. Retire la vejiga urinaria y examine contenidos en un portaobjetos. Abra la vejiga bajo agua y examínela.
10. Corte los riñones y haga preparaciones aplastadas.
11. Examine la musculatura. Prepare porciones aplastadas por si existieran protozoos. Corte la musculatura en porciones delgadas. Métodos especiales para la detección de larvas de helmintos incluyen:
 - a) Prueba al trasluz: se examina la musculatura a través de una pantalla de vidrio esmerilado iluminado desde atrás con luz fluorescente.
 - b) Digestión de la musculatura utilizando una mezcla de pepsina/ácido clorhídrico a 37-50°C.
12. Saque el cerebro y examínelo. Prepare porciones aplastadas.

(Impreso para los resultados de disecciones de peces).

2.2 Examen de los parásitos vivos

En este examen se siguió el método Bullock 1978.

La observación de parásitos, y a menudo su identificación, puede realizarse en agua o solución salina.

Los Mixosporidios coelozoicos pueden encontrarse examinando preparaciones aplastadas húmedas de la vesícula biliar, vejiga urinaria, ureteres y riñón. La mayoría de los Mixosporidios histozoicos, excluyendo la *Myxosoma cerebrialis*, se encuentran en quistes blancos que pueden observarse a simple vista o con un microscopio de disección con diez aumentos. La presencia de la vacuola de glucógeno es importante en la identificación, y la dilución Lugol es a menudo inadecuada para este propósito debido a que algunas vacuolas yodofilas sobreviven el almacenamiento, mientras que otras no.

Para poder realizar un diagnóstico crítico se necesita conocer la envoltura mucosa de las esporas frescas, el tamaño de las esporas, la morfología y el tamaño de la cápsula polar, el grosor de la válvula y la morfología del esporoblasto, para lo cual se utiliza el método de la tinta de Lom.

Solución de yodo parasitológico:

10 g yoduro de Potasio

5 g yodo

100 ml H₂O

Disolver el yodo en una pequeña cantidad de agua y yoduro de potasio antes de agregar toda el agua.

Tinta India de Low:

1 parte de tinta India

4 partes de suspensión de esporas

Con respecto a los Trematodes Monogenea, Bauer et al (1973) recomiendan el examen en preparaciones temporales. Los ganchos de fijación y el órgano copulador se pueden reconocer mejor en especímenes vivos.

2.3 Fijación de parásitos

2.3.1 Fijación de protozoos

Se empleó el método de Bauer et al 1973.

Para la fijación de protozoos se pueden utilizar varios medios, algunos de los cuales se describen a continuación.

Con líquido de Schaudinn

Esparza el mucus donde están contenidos los parásitos en una capa fina sobre el portaobjeto. Luego coloque el portaobjeto con el material hacia abajo en una jarra con líquido de Schaudinn (ver Ap. 1) por un período de 15 a 20 minutos, lavándolo entonces con etanol 70°. Luego transféralo a una solución de yodo etanol 70° (la solución deberá tener color té fuerte). El

yodo remueve el cloruro de mercurio. Manténgalo en dicha solución hasta que quede de color marrón. Entonces lávelo con alcohol 70° hasta su completa decoloración y guárdelo en un envase de portaobjetos. Para prevenir que los portaobjetos se toquen entre sí, se colocan aros de papel grueso entre ellos para separarlos. El diámetro interior de estos aros deberá dejar libre el frotis. Finalmente, etiquete los portaobjetos y tñalos con hematoxilina de hierro (ver Ap. I).

Impregnación con plata según el método de Klein

Este método es especialmente útil para Trichodina. Coloque el mucus en un cubre-objetos, séquelo y sumérjalo en una solución de nitrato de plata al 2% (AgNO_3). Lávelo con agua destilada y expóngalo a la luz hasta que oscurezca. En luz difusa necesitará de 4 a 10 horas y al sol de 30 a 60 minutos. Lávelo, séquelo y colóquelo en bálsamo. Las esporas de mixosporidios se colocan en glicerol-gelatina o en pícrato de amonio. (ver Trematodes Monogénea).

Seque las muestras de sangre, fijelas por 5 minutos en metanol sin agua y tñalas con GIEMSA (ver Ap. II)

2.3.2 Fijación de Nematodos

Se utilizó el método de Healy et al, 1978.

La mayoría de los Nematodos puede fijarse en alcohol 70° caliente o en alcohol acético (1 parte de ácido acético y 3 partes de alcohol 95°). Los Nematodos se almacenan en alcohol 70°. Se agregan unas pocas gotas de glicerina a fin de impedir la desecación en caso de evaporarse el alcohol durante ese tiempo.

Los adultos y larvas de 2-3 mm o menos se fijan mejor usando una solución de ácido acético al 0,5%. Se utiliza una mezcla de 4% de formol y 1% o 0,5% de ácido acético para la fijación y almacenamiento.

Los Nematodos se pueden aclarar en glicerina, alcohol-fenol o en lactofenol. Luego, y antes de colocarlos nuevamente en la solución de preservación se lavan en alcohol 70°.

Alcohol-fenol: 80 partes de cristales de fenol fundido
y 20 partes de alcohol absoluto

Lactofenol: 20 partes de agua destilada,
40 partes de glicerina,
20 partes de ácido láctico y
20 partes de cristales de fenol fundido.

2.3.3 Trematodes Monogenea

Se los libera del mucus tanto como sea posible. Los especímenes grandes se fijan como los Trematodos Digenéticos y los Céstodos (ver punto 2.3.4).

Los especímenes pequeños pueden colocarse en distintos medios: Bullock (1978) prefiere jalea de glicerina, mientras que Bauer et al (1973) prefiere la utilización de preparaciones de glicerina-gelatina (ver Ap. III) o una mezcla de glicerina y solución saturada de picrato de amonio al 1:1 (1 g en 100 ml de agua). Estas preparaciones deberán mantenerse con bálsamo, barniz de asfalto, laca de uñas o cera de colofonio.

2.3.4 Trematodos Digenea, Céstodos y Acantocéfalos

Los Digenea y Acantocéfalos deben dejarse en reposo en agua de canilla o mejor aún en agua destilada. Los Acantocéfalos deben tener la proboscide completamente extendida de tal manera que se pueda observar. También debe estar limpia de mucus antes de la fijación, si es que se requiere la identificación de la especie. Los especímenes de los tres grupos se fijan entre dos portaobjetos, y si fuera necesario, se coloca una pesa. El agente de fijación puede ser introducido por el extremo del portaobjeto.

Bullock (1978) recomienda utilizar formol neutro caliente (4%) para la fijación, luego de 24 horas se lavan en agua destilada y se almacenan en alcohol 70°. Bauer et al (1973) recomiendan la utilización de alcohol 70°. Los especímenes que van a ser seccionados para investigación histológica pueden fijarse con el líquido de Bouin.

2.3.5 Sanguijuelas (Hirudinea)

Se siguió el método de Richardson 1975.

Se las narcotiza en una solución de eter 4% en agua. Esta narcotización es rápida, ocurriendo la muerte entre dos y cinco horas, dependiendo de la temperatura y el tamaño del individuo.

Deberá removerse el mucus del espécimen muerto, luego se extiende derecho sobre papel de filtro húmedo y se cubre con

papel de filtro apenas mojado con formol 5°. Se deja endurecer por 12 horas y luego se les conserva en formol 5°.

2.3.6 Crustáceos

Se fijan y almacenan en alcohol 70° (Bullock 1978, Bauer et al 1973).

2.4 Agentes de fijación de uso común en ictioplanctología

El estudio sobre agentes de fijación se basa en Bullock 1978.

Probablemente, el más ampliamente utilizado es el formol. Se obtiene en forma concentrada de 40% por peso. Su mayor desventaja como agente de fijación es la irritación que provoca en el sistema respiratorio y en los ojos del manipulador; además, sintetiza la piel produciendo "dermatitis por formol". El formol comercial tiene una acidez de 3-5, por lo tanto, se deberá tener cuidado en verificar el pH final de cualquier agente de fijación basado en formol.

2.4.1 Formol con Buffer de fosfato

100 ml formol 40°

200 ml agua cenilla o destilada

4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

6 g Na_2HPO_4

La mayoría de los tejidos pueden ser fijados en forma adecuada en un período de 8 a 24 horas para diagnóstico rutinario; si se desea obtener preparaciones óptimas, deberá emplearse un tiempo de fijación considerablemente más largo.

2.4.2 Susa de Heidenhain

45 g cloruro de mercurio
5 g cloruro de sodio
20 g ácido tricloroacético
40 ml ácido acético
100 ml formol
800 ml agua destilada

Probablemente, el Susa es el mejor agente disponible para una fijación rápida de pequeñas porciones de tejido. El cloruro de mercurio precipita las proteínas, las que rápidamente son penetradas y se endurecen. La tasa de penetración decrece luego de 2-3 min, por lo que los bloques de tejido no deberán exceder los 5 mm³; con más de 5 mm³ van a quedar sobrefijados en la periferia e inadecuadamente fijados en el centro.

El espécimen deberá ser transferido a alcohol 95° para su procesamiento ya que la inmersión en solución acuosa resulta en un excesivo entumescimiento de cualquier tejido conjuntivo presente. El cloruro de mercurio deberá ser retirado antes de la tinción incorporando los bloques o las secciones en una solución de 0,5% de yodo en alcohol 80°.

Como desventaja puede mencionarse que el cloruro de mercurio es altamente tóxico y corrosivo; deberá tenerse cuidado al emplearlo.

No deberá almacenarse en envases de metal o con tapa de metal. Además, es una solución de alto costo, como para usarla en forma rutinaria.

2.4.3 Líquido de Bouin

75 ml ácido pícrico acuoso saturado
25 ml formol
5 ml ácido acético

Penetra rápidamente con poca pérdida o deformación, produce una rotura parcial de las células sanguíneas y tiene un efecto entumecente en las fibras de colágeno.

Las porciones pequeñas de tejidos, 2-3 mm de grosor, se fijan en 2-3 horas; las porciones más grandes requieren hasta 24 horas.

El ácido pícrico precipita las proteínas y se combina con ellas para formar picratos; algunos de ellos son solubles en agua, de forma que el material fijado deberá ser transferido directamente a alcohol a fin de prevenir la disolución de estos picratos. El líquido de Bouin no es recomendable para preparaciones de piel ya que hace mucho más difícil el corte de escamas y el entumecimiento es extremo.

2.4.4 Líquido de Carnoy

60 ml alcohol absoluto
30 ml cloroformo
10 ml ácido acético

Probablemente, este líquido es el que penetra más rápidamente en los tejidos, pero causa una considerable contracción de los mismos y se destruyen muchos componentes del citoplasma. Se puede reducir en algo dicha contracción realizando la fijación a 0°C. La fijación de una porción de 5 mm de espesor generalmente se completa en un período de 1-2 horas, y para especímenes pequeños, unos 15 min son suficientes.

2.4.5 Otros líquidos

Los siguientes dos agentes se utilizan para la fijación de bilis, pituitaria y material pancreático.

Líquido de Zenker

5 g cloruro de mercurio
2,5 g dicromato de potasio
1 g sulfato de sodio
150 ml agua destilada
5 ml ácido acético glacial (agregarlo inmediatamente antes de usar)

Líquido de Helly (Zenker-formol)

5 g cloruro de mercurio
2,5 g dicromato de potasio
1 g sulfato de sodio
100 ml agua destilada
5 ml formol (concentrado) (agregarlo inmediatamente antes de usar)

Para ambas fijaciones es necesario lavar el tejido durante 12-24 horas antes del proceso.

2.4.6 Líquido de Gendre

80 ml ácido pícrico, solución saturada en 35% de alcohol
15 ml formol (concentrado)
5 ml ácido acético glacial

Este agente resulta particularmente útil para la demostración de glucógeno.

2.5 Decalcificación

Estas técnicas de decalcificación se basan en Bullock 1978. No son utilizadas frecuentemente en laboratorio, pero aún así deben ser mencionadas.

El objetivo de la decalcificación es remover los iones de calcio de las partes óseas del espécimen sin dañar otros componentes, facilitando así el corte en secciones. El prerequisite más importante para lograr una decalcificación satisfactoria es que el tejido deberá ser fijado antes de exponerlo al líquido decalcificante.

2.5.1 Decalcificación ácida

Se ha probado como satisfactorio el uso de 8% de ácido fórmico en agua destilada. Esta solución deberá revolverse a menudo (cada 8-12 horas) y cuando se complete la decalcificación, el tejido deberá ser transferido a alcohol 70°. Un método alternativo incorpora el uso de ácido tricloroacético en una solución al 5%, preparado en el momento. Con este método la decalcificación se produce bastante rápido obteniéndose una buena tinción posterior y, al igual que con el

ácido fórmico, el tejido, luego de la descalcificación deberá ser transferido directamente a alcohol 70° antes de la deshidratación.

2.5.2 Método de quelación

El mejor método para la descalcificación de tejidos de pescados es usar un agente quelante: ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA). Puesto que no se forman burbujas de gas con esta técnica, resulta menos probable la ruptura de los tejidos. La solución es activa en un pH neutro, de forma que no afecta las tinciones subsecuentes.

Solución descalcificante EDTA

250 g EDTA

1750 ml agua destilada

Se ajusta la solución a un pH neutro por medio de la adición de NaOH. Con él se obtienen excelentes resultados, pero existen dos desventajas con este método:

- a) es lento, pues necesita varios días
- b) la prueba química para conocer el punto de descalcificación es particularmente inexacta para este método.

2.5.3 Punto de descalcificación

Para conocerlo, la mejor forma es por medio de un examen de rayos x. El método menos exacto es la prueba química debido a la presencia o ausencia de iones de calcio.

Se agrega amoníaco fuerte a 5 ml del líquido descalcificante bajo examen hasta que la muestra quede aproximadamente neutra. A esto se le agrega 1 ml de oxalato de sodio o amoníaco al 5%. Si la solución queda turbia, indica que hay calcio presente. Si no se enturbia luego de un período de 5 minutos indica que el líquido no tiene calcio, lo cual significa que los sales de calcio fueron removidos del tejido y que se pueden realizar el resto de las etapas del procesamiento.

Los agentes descalcificantes son útiles en histología de peces. Sin embargo, existen limitaciones estrictas sobre su uso en el tegumento. A menudo se presume que la descalcificación de las escamas de peces resultará en mejores preparados de piel; lo cual rara vez es el caso, aunque las escamas contienen sales de calcio. La deformación y ruptura de la proteína en las escamas resultantes del empleo de agentes descalcificantes, a menudo impiden que la preparación resultante sea adecuada para realizar los exámenes subsiguientes.

2.6 Procesamiento de tejidos fijados

Se realiza según Bullock 1978. Antes del procesamiento, es necesario estudiar la necesidad de realizar un tratamiento postfijativo, tal como la transferencia directa a una solución de alcohol; con líquido de Bouin o períodos extensos de lavado con líquido de Zenker.

Antes de poder examinar microscópicamente cualquier material fijado debe ser infiltrado con un medio que le de resistencia para permitir cortar las porciones delgadas (5-7 mm). Generalmente, la

sustancia utilizada es la parafina, aunque pueden emplearse otras sustancias como celodine o gelatina. El proceso de fijación incluye deshidratación con alcohol de alta graduación, aclarándolo con agentes como xileno y el cloroformo, que permiten la posterior impregnación con cera.

2.6.1 Deshidratación

Generalmente se inicia la deshidratación con una solución de alcohol 50-70° en agua a fin de prevenir la deformación que ocurriría si se transfiriera directamente al alcohol. Resulta una ventaja, particularmente cuando se trabaja con tejidos duros, como piel, incorporar al procesamiento una serie de baños en alcohol metil fenol al 8%, ya que el fenol produce un ablandamiento de los tejidos. Los tejidos, finalmente, se transfieren a un baño de alcohol absoluto para completar la deshidratación.

2.6.2 Clarificación

Puesto que el alcohol no puede mezclarse con la parafina, es necesario primeramente tratar el tejido con un agente que pueda mezclarse con ambas sustancias. Dentro de los varios agentes utilizados a estos fines, quizás el más comúnmente usado sea el xylene, que además posee la ventaja de hacer que el bloque quede transparente luego de que la clarificación se complete. Es de acción rápida pero tiende a hacer que los tejidos queden frágiles luego de una exposición prolongada. Por otra parte, el cloroformo no produce el mismo efecto de endurecimiento que el xilene y se le considera más satisfactorio. Posee el inconveniente de que su punto de ebullición es muy bajo (60°C); si los bloques son transferidos directamente a la parafina a una temperatura mayor de 59°C, podría haber ruptura de tejidos con pésimos

resultados. Según la experiencia del autor, los mejores resultados se obtuvieron clarificando los tejidos durante la noche con cloroformo y luego en dos etapas de media hora cada una con xileno.

2.6.3 Inclusión en parafina y endurecimiento

Lo mejor es que la parafina tenga la misma dureza que el tejido a investigar, lo que rara vez se logra, debido a la gran variedad de consistencias de los tejidos de los peces. La dureza de la parafina se indica a través de su punto de fusión (M.P.), cuanto más dura es, mayor será su punto de fusión. Para trabajo rutinario con tejidos de peces con una considerable variedad de consistencias de tejidos, resulta particularmente útil un medio como el polywax que consiste en una mezcla de parafina y polímeros plásticos.

Esto brinda una matriz sólida que soporta al tejido y se realiza en envases de vidrio o porcelana, enfriando y endureciendo la parafina con trozos de tejido en el interior.

1. Los moldes de metal y vidrio deberán ser recubiertos con glicerina a fin de impedir que la parafina se adhiera a la superficie.
2. Luego se evapora la parafina fundida en el molde.
3. Por medio de una pinza calentada se transfiere y orienta el tejido.
4. Para su identificación se le etiqueta con un número.
5. Luego de su solidificación completa, el bloque se saca del molde y se monta sobre bloques de madera para su microtomía.

2.6.4 Corte

Por medio de un micrótomo se realizan cortes de bloques de 5µm. Se deberán considerar dos factores muy importantes para realizar cortes satisfactorios: a) un cuchillo limpio y afilado, y b) reducir la temperatura del bloque, si fuera necesario con hielo durante varias horas, lo cual aumenta su dureza. Esto resulta particularmente útil cuando se examina por ejemplo, piel.

Se hace flotar las secciones en un baño maría a 48°C y se colocan en portaobjetos limpios químicamente cubiertos con una fina capa de sustancia adhesiva como ser albúmina, glicerina.

2.6.5 Desparafinado

Se deberá transferir las secciones en dos baños de xileno cada uno de 5-10 minutos de duración, luego por medio de graduaciones descendentes de alcohol, absoluto, 90°, 70°, 50°, a agua. Si fuera necesario se incluirá la eliminación de precipitaciones de mercurio.

2.6.6 Eliminación de las precipitaciones de mercurio

1. Colocar la sección en 0,5% de yodo en alcohol 80° por 3 min
2. Lavar bien en agua destilada.
3. Colocar en una solución de 3% tiosulfato de sodio y agua destilada.
4. Lavar en agua corriente por 3 minutos

2.6.7 Tinción

Los distintos métodos para teñir se mencionan en el Apéndice VI.

2.6.8 Deshidratación

Se transfiere las secciones a través de graduaciones ascendentes de alcohol, 50°, 70°, 90°, absoluto, y en dos baños de xileno.

2.6.9 Inclusión

Se retiran las secciones completamente deshidratadas, se las coloca en una gota de resina o bálsamo de Canadá y se las recubre con un cubreobjeto. El medio de inclusión deberá dejarse endurecer por algunos días.

3. ORIGEN DEL MATERIAL

En el período comprendido entre el 24 de noviembre y el 9 de diciembre de 1981 se capturaron ejemplares adultos salvajes de Rhamdia sapo en la Laguna del Sauce, Uruguay, por medio de redes de enmalle y trampas, y posteriormente transportados al laboratorio de INAPE en Montevideo. Luego de la hipofisación y desove artificial, se les sacrifica con un golpe en la cabeza y se disecan inmediatamente, según las instrucciones del punto 2.2.

Además, los bagres cultivados en la estación de piscicultura de INAPE en Salto, Constitución, fueron examinados durante una visita de dos días (18 y 19 de febrero de 1982). Dichos exámenes se restringieron a ejemplares enfermos y moribundos, seleccionados durante su medición y posterior transferencia a los estanques.

4. RESULTADOS PRELIMINARES

Debido a la pequeña cantidad de peces examinados y en tan poco tiempo, no se pueden emitir conclusiones sobre la epidemiología de las enfermedades producidas por parásitos en los bagres, pero sí permite el establecimiento de una colección de referencia para ser empleada en INAPE.

En los bagres adultos de Laguna del Sauce se encontró lo siguiente:

Trematodo monogenético (fam. Dactylogyridae) - en 6 bagres
 1 Trematodo cada 3-4 lamellas branquiales primarias.
 Hirudineo en las branquias (25 especímenes en 6 bagres)
 Cestodo proteocephalido en el yeyuno (164 especímenes en 14 bagres)
 Nematodo en el yeyuno (14 especímenes en 14 bagres)
 Acantocéfalo en el duodeno (51 especímenes en 14 bagres)
 Argulido en la piel (1 espécimen en 14 bagres)

En INAPE existe un especialista en Trematodos monogenea quien puede encargarse de la identificación. El resto de los helmintos deberán ser estudiados fuera de INAPE, para lo cual ya se han iniciado los contactos correspondientes. Los argulidos podrán ser identificados por medio de literatura brasileña, información que estará disponible en breve.

Ringuelet (1968) menciona el hirudineo en una clave de identificación:

Cuatro ojos, color blanco, parásito del bague negro
Myzobdella spec. innominada. Argentina (Buenos Aires: Río Salado).

En los bagres cultivados en la Estación de Piscicultura de Salto, Constitución, (long. entre 7 y 11 cm) se encontró lo siguiente:

Ciliado, *Ichthyophthirius multifiliis* en 4 bagres, identificados por la forma de herradura de su núcleo en montajes temporarios y teñidos de mucus de piel y en secciones histológicas de piel. Se notó que en uno de estos bagres infectados la piel no presentaba ninguna mancha blanca, como es lo típico para *Ichthyophthiriasis*.

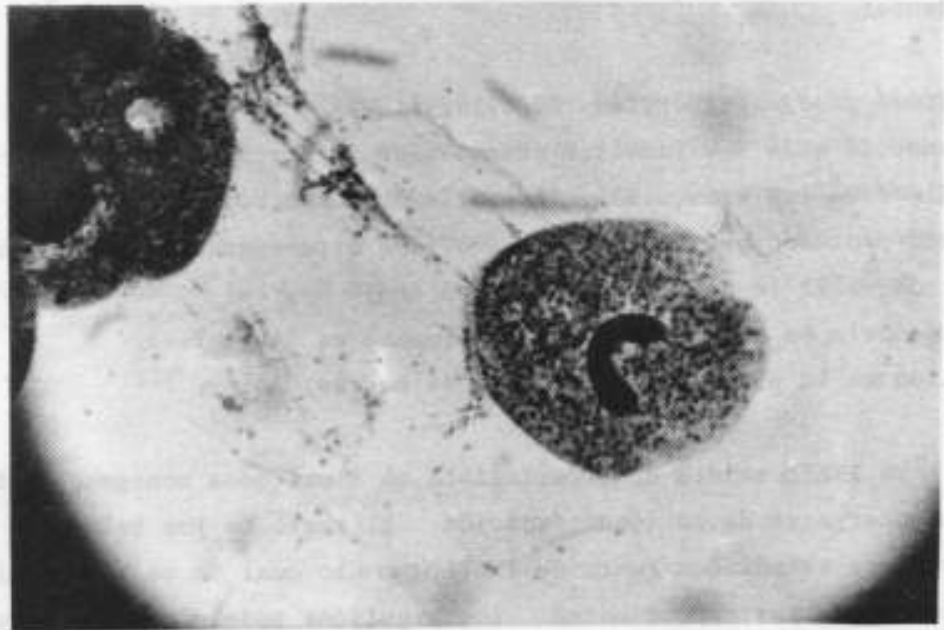


Foto No. 1: Raspaje de piel de bagre negro *Rhamdia sapo*. *Ichthyophthirius multifiliis* Ciliado, identificado en el núcleo con forma de una herradura. Tinción con hematoxilina. Aumento : x400.

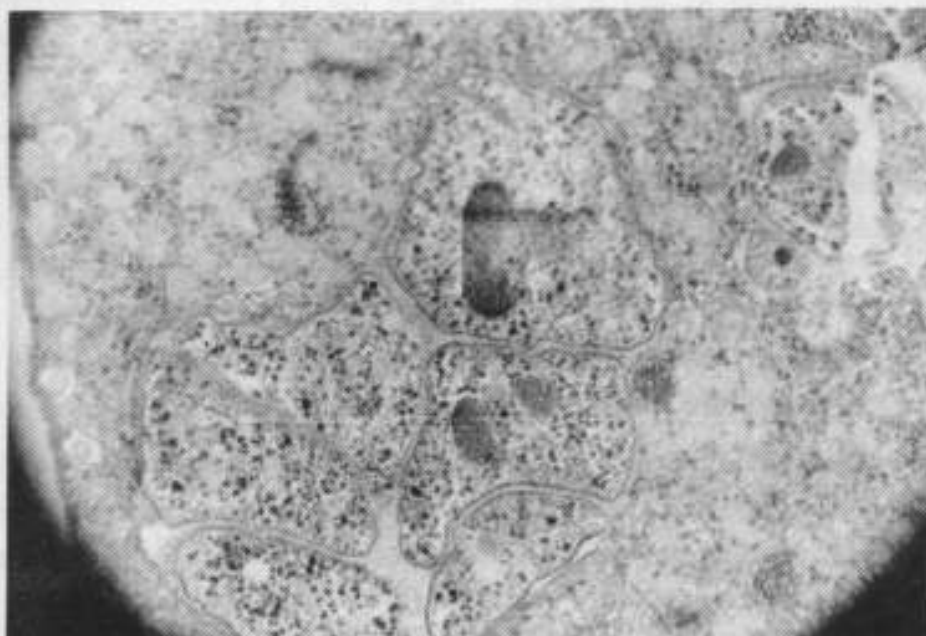


Foto No. 2: Sección del corte histológico de piel de bagre negro, Rhamdia sapo. El parásito Ichthyophthirius multifiliis ubicado en el epitelio, núcleo cortado dos veces. Tinción con hematoxilina y eosina. Aumento: x400.

La prueba para parásitos enquistados por medio de los métodos de transluz y digestión fue negativa.

Tres de los bagres moribundos presentaron úlceras cutáneas muy extensas. El examen microscópico de dichos especímenes fue negativo y se presume que sus enfermedades habían sido causadas por bacterias u otros agentes.

5. RECOMENDACIONES PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES EN PISCICULTURA

5.1 Medidas de prevención

1. Abastecer los tanques con agua de un pozo y evitar el uso de agua de río o lago, debido a que éstas podrían llevar larvas de parásitos. Si no fuera posible obtener agua de pozo, debería filtrarse el agua con arena gruesa.
2. Impedir el ingreso a cualquier pez descartado o salvaje que pueda ser portador de enfermedades, así como de invertebrados que pueden ser huéspedes intermedios de parásitos helmínticos.
3. Secar y tratar los estanques regularmente con cal viva a fin de eliminar los parásitos u otros agentes de enfermedades tales como bacterias, fungi, virus, etc.
4. Separar en grupos por edad de modo de prevenir el contagio de enfermedades entre una generación y otra.

Estas medidas de prevención son de vital importancia para mantener la salud y permitir el crecimiento de cualquier especie en cultivo y deberán ser aplicadas siempre.

5.2 Directivas a seguir en el tratamiento

En el cultivo de peces, se da mayor énfasis a la prevención que a la curación de enfermedades. A la larga, la prevención resulta más barata e impide el problema de toxicidad del medio ambiente y el

problema de residuos en los peces. Sólo a fin de evitar pérdidas masivas en el caso de una epizootia, los peces deberán ser tratados con productos químicos no tóxicos o biodegradables. Debido a problemas metodológicos y económicos, el piscicultor dará casi siempre mayor prioridad a métodos simples y baratos como ser el tratamiento químico externo, por lo cual este tipo de método recibirá preferencia en esta publicación.

Poupard (1978) mencionó las condiciones específicas del medio acuático que deberán ser consideradas cuando se planifique utilizar un tratamiento químico externo, por lo cual recomendó:

1. Retirar el alimento por un período de 12 a 48 horas (dependiendo de la temperatura) antes del tratamiento, lo que reduce el consumo de oxígeno y la producción de amoníaco. En períodos de tiempo cálido, el tratamiento deberá realizarse a la hora del día en la cual la temperatura del agua es la menor.
2. Se deberá verificar el estado de las branquias. Si hubiera evidencia de parasitismo en las branquias, debería ser tratado en primer lugar.
3. Se debería llevar a cabo una prueba de tratamiento de un pequeño grupo representativo de peces antes de realizar el tratamiento central bajo las mismas condiciones. Es esencial un período de espera de 12 a 24 horas antes de realizar el tratamiento del total del stock a fin de detectar la posible aparición de stress en los peces. Es vital que alguien se encargue de re verificar los cálculos de la dosis del tratamiento químico.
4. Se deberá evaluar las concentraciones de oxígeno disuelto y los peces deberán ser observados a lo largo del tratamiento. Si hubiera alguna evidencia de stress entre los peces, se debería concluir el tratamiento de forma inmediata.

5. Al igual que con los otros procedimientos de piscicultura, se deberá registrar los detalles y resultados del tratamiento.

5.3 Ichthyophthiriasis

El laboratorio de INAPE y la Estación en Salto, Constitución, han sufrido ya varios problemas por su causa, siendo el responsable de pérdidas masivas en el cultivo de bagre negro Rhamdia sapo.

La terapéutica para Ichthyophthiriasis presenta varios problemas. El parásito se ubica profundamente en el epitelio y no es afectado por la mayoría de los productos químicos utilizados para eliminar parásitos en peces.

Poupard (1978) recomienda un método, muy efectivo, que consiste en la inmersión en 0,1 ppm verde malaquita y 15-25 ppm formol por menos de 24 horas; se debe repetir el tratamiento 2 o 3 veces luego de 3 días. Sin embargo, el verde malaquita que se comercializa en Uruguay contiene varias sales con distinta toxicidad, y se intenta encontrar un verde de malaquita que no contenga zinc, y por lo tanto, no tóxica en dosis terapéuticas. Especialmente al comienzo de una epizootia, en la Estación aplican actualmente 1 ppm de permanganato de potasio. Bauer et al (1973), recomienda, especialmente para aquellas granjas que ya han tenido problemas con este parásito, sustituir el desove natural por fecundación artificial.

Shepherd (1978) mencionó que la resistencia genética podría resultar en un método efectivo de controlar la enfermedad provocada por algunos parásitos, bacterias y virus. En caso de que no sea posible eliminar totalmente la enfermedad, el uso de los sobrevivientes como reproductores podría indicar una resistencia ante posibles

futuras epizootias tanto por selección natural o artificial de los peces que presentan esta característica; pero se debe tener presente que los supervivientes también pueden ser portadores de la enfermedad. En la Estación de Salto, Constitución, se observaron indicios sobre la existencia de diferentes linajes de los *Rhamdia sapo* con distinta resistencia contra la Ichthyophthiriasis. Por esta razón, se debería considerar la posibilidad de la selección de un bagre negro más resistente. El problema de que los sobrevivientes sean portadores de la enfermedad podría resolverse a través de la fecundación artificial. Kirpichnikov (1981) brinda una introducción sobre la selección de procedimientos al respecto.

5.4 Sugerencias de tratamientos para otras enfermedades

Uno de los tratamientos tradicionales para las enfermedades de los peces es el uso del formol. Paperna (1980) recomienda el empleo de 15-25 ppm de formol durante una hora para tratar enfermedades de la piel producidas por: Trichodina, Costia, Epistilis, Glossatella, Scyphidia y Trichophyra. El control de Chilodonella requiere una mayor concentración de formol, 40-50 ppm por un mínimo de 20 horas.

Bailosoff (1965) comprobó la eficacia del uso de una solución de Neguvon al 2-2,5% (Metrifonat o Trichlorofon, formula al 97%), contra Dactylogyrus, Gyrodactylus, Chilodonella, Trichodina, y Argulus. Los peces (carpas y truchas) fueron sumergidos durante 3 minutos a una temperatura de 15°C aproximadamente.

Brandal y Egidius (1979) sumergieron salmonidos por un período de 15-60 minutos en una solución de Neguvon a 300 ppm a fin de eliminar el piojo de salmón *Lepeophtheirus salmonis*.

Plate (1970) realizó una revisión de la información sobre la eficacia del uso de masoten (Metrifonat, 80% formula) contra varios

parásitos. En la Tabla I se indican los tiempos de inmersión y concentraciones efectivas, según la opinión de varios autores, de acuerdo a Plate (1970).

Tabla I

Tratamiento con masoten según Plate (1970)

Parásito	Concentración	Tiempo de inmersión
Argulus, Lerneá	0,2-0,4 ppm	24 horas más en el estanque
Dactylogyrus, Gyrodactylus, Sanguijuelas Parasitas	0,25-0,5 ppm	24 horas más en el estanque
Trichodina	2 ppm	24 horas más en el estanque
Argulus, Dactylogyrus, Gyrodactylus	2-2,5%	baño de 3 minutos

Los huevos de Argulus no son afectados por concentraciones de 0,5 a 10 ppm, por lo que el tratamiento deberá ser repetido luego de los 20-25 días.

Obermeier (1974) recomendó también el uso de masoten en 0,2-0,4 ppm de concentración en los estanques y con 2-2,5% en un baño de 5-10 minutos para Argulus, Dactylogyrus y Gyrodactylus.

Asimismo, el Argulus puede ser controlado por medio de la instalación de una madera en los estanques. Las trampas de madera de 1.0 x 0,5 m se colocan sumergidas bajo el agua a manera de un tablero de ajedrez delante de la salida del agua como un sustrato para la oviposición de Argulus.

Cada 15-20 días se deberá remover las maderas, secarlas por un día y luego se las vuelve a colocar (Bauer et al 1973).

La aplicación de hidrocarburos clorados es muy problemática debido a que son contaminantes muy persistentes en el medio ambiente y no son biodegradables. Asimismo, se informó la resistencia producida al lindano, un hidrocarburo clorado, por el Argulus luego de repetidos tratamientos (Paperna 1980).

Para controlar los Cestodos y Nematodos intestinales, se administra Mansonil en una relación de 500g/100kg de comida seca, que debe nutrir con 1,5% del peso del pescado. Para los Cestodos se deberá repetir tres veces el tratamiento cada dos semanas (Reichenbach-Klinke 1975).

También, se puede controlar los Cestodos por medio de la aplicación de Yomesan, 0,1-0,15mg/kg de comida seca o 0,2-0,5mg/kg de peso del pescado (Reichenbach-Klinke 1975).

Se administra di-n-butil-óxido de estaño a una relación de 25kg/100kg de comida seca durante más de dos días contra los Trematodos intestinales y por más de cuatro días, repitiendo el tratamiento una semana después, para Acanthocefalos (Reichenbach-Klinke 1975).

Para el tratamiento de Hexamita, un protozoario intestinal, se puede aplicar lo siguiente (según Reichenbach-Klinke 1975):

Gabbrocol (Farmitalia)	1,5 kg/100kg comida seca por 4-7 días
Acinitrazol (Fluka)	1g/25kg comida seca por 4 días
Enheptin	200g/100kg comida seca por 3 días

Las infecciones provocadas por Mixosporidios y Microsporidios no pueden ser tratadas. Estos Protozoos deberán ser eliminados matando todo el stock de peces y desinfectando el estanque con cal viva a razón de 2,5ton/hectárea (Bauer et al 1973).

Reichenbach-Klinke (1975) recomienda el uso de Cianamida de calcio al 0,5-0,75kg/m² sobre tierra seca, dos veces al año contra Myxosoma, Protozoa patógeno verdaderamente difícil de controlar. La exposición del agua a rayos ultravioletas, el mantener la cría en tanques de plástico, concreto o vidrio hasta que alcancen los 6 cm de longitud, y el cubrir el fondo del tanque con hojas plásticas como prevención, contribuyen también al control de esta enfermedad.

5.5 Reacciones inmunológicas

Las reacciones inmunológicas en los peces dependen principalmente de la temperatura. Por ejemplo, a una temperatura de 12°C las carpas demoran mucho tiempo en la formación de anticuerpos e importantes mecanismos de protección no se inician. Las temperaturas óptimas para permitir la formación de anticuerpos son 18-27°C para las carpas y de 17°C para las truchas. Estas temperaturas son especialmente necesarias para la iniciación de la respuesta inmunológica a un antígeno.

Esto es muy importante para el piscicultor. Luego de la invención el piscicultor deberá considerar el cultivo de juveniles en las temperaturas adecuadas por 14 días y recién entonces transferirlos a los estanques de aguas más frías.

Los peces tienen reacciones inmunológicas frente a la mayoría de las enfermedades económicamente importantes causadas por parásitos, bacterias, hongos y virus. Una correcta alimentación y una densidad

baja o media ayudaría a mantener los peces saludables y evitar pérdidas masivas.

Asimismo, es posible impedir o reducir las epizootias por medio de cambios en las temperaturas.

5.6 Recomendaciones finales

Para el futuro, se recomienda recolectar material de peces enfermos y moribundos con regularidad.

Se deberían fijar raspajes de piel y de branquias en el líquido de Schaudinn, los tejidos en Susa o Bouin, y se debería inocular medios en recipientes de vidrio para el cultivo de bacterias. Estas fijaciones y cultivos pueden ser transportados por correo desde Salto a Montevideo, para su procesamiento. Este trabajo sería de gran importancia a fin de detectar y reconocer cualquier enfermedad a tiempo.

BIBLIOGRAFIA

- Bailösoff, D. - Neguvon -ein wirksames Mittel zur Bekämpfung der
 1963 Karpfenlaus und sonstiger parasitärer Fischkrankheiten.
 Vet.-Med.Nachr., Heft 1, p.60-63.
- Bauer, O.N., V.A. Musselius & Yu.A. Strelkov - Diseases of pond
 1969 fishes. Trad.del Ruso. Israel Programme for Scientific
 Translations. Jerusalem 1973.
- Brandal, P.O. & E. Egidius - Treatment of salmon lice (Lepeophtheirus
 1979 salmonis, Krøyer, 1838) with Neguvon -Description of
 method and equipment. Aquaculture, 18 (1979) 183-188.
- Bullock, A.M. - Laboratory Methods. En: R.J.Roberts (ed): Fish
 1978 Pathology. Bailliere Tindall, Londres, 1978, p.235-267.
- Healy, G.R.; G.J.Jackson; J.R.Lichtenfels; G.L.Hoffman & Th.C.Cheng -
 1978 Foodborne parasites. En:Compendium of methods for the
 microbial examination of foods. Preparado por AFHA Inter-
 society/Agency Committee on microbial methods for foods.
 Marvin L. Speck, EEUU, 1978, p.471-483.
- Kirpichnikov, V.S. - Genetic Bases of Fish Selection. Trad.del Ruso
 1981 por G.G.Gause. Ed.Springer, Heidelberg, Berlin, Nueva York.
- Needham, T. & R.Woother - The Parasitology of Teleosts. En: R.J.
 1978 Roberts (ed): Fish Pathology. Bailliere Tindall, Londres
 1978 p.144-182.
- Obermeier, P. - Moderne Arzneimittel für Fische, Masoten: Bekämpfung
 1974 der Ektoparasiten. Vet.-Med.Nachr., Heft 2, p.158-165.

- Paperna, I. - Parasites, infections and diseases of fish in Africa.
1980 FAO Doc.Tec.7, 216p.
- Plate, G. - Masoten für die Bekämpfung von Ektoparasiten bei Fischen.
1970 Arch.Fischereiwiss. 21 Heft 3, 258-267, Berlin, 1970.
- Poupard, C.J. - Therapy of fish diseases. En: R.J.Roberts (ed): Fish
1978 Pathology. Bailliere Tindall, Londres, 1978, p.268-275.
- Richardson, L.R. - A convenient technique for killing and preserving
1975 leeches for general study. J. Parasitol. 61, 78 (1975).
- Reichenbach-Klinke, H.H. - Bestimmungsschlüssel zur Diagnose von
1975 Fischkrankheiten, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Ringuelet, R.A. - Llave o clave para el reconocimiento de las sanguijuelas
1968 conocidas de la República Argentina (Mirudinea) y apuntamientos
sobre la hirudofauna neotrópica y transicional mexicana.
Physis 27, 368-390 (1968).
- Shepherd, C.J. - Husbandry and Management in relation to disease. En:
1978 R.J. Roberts (ed): Fish Pathology. Bailliere Tindall,
Londres, 1978, p.276-283.
- Wiesmann, A. - Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag, 1978.

Apéndice IHematoxilina de Hierro de Heidenhain

Se disuelven 0,5 g de hematoxilina cristalina en 10 ml de alcohol 96°. Este se disuelve con 90 ml de agua destilada y se transfiere a un frasco con un tapón de algodón suelto. Luego de su maduración por 3-4 semanas, el colorante queda listo para usar. Antes de usar deberá diluirse en agua destilada al 1:1.

Tinción con hematoxilina de hierro para protozoarios fijados en el líquido de Schaundin

Se transfiere los frotis del alcohol 70° a agua por varios minutos a fin de eliminar el alcohol. Luego se les mantiene en una solución al 3% de sulfato férrico de amonio por 2-8 horas, se enjuaga en agua y se le deja por 6-24 horas en la solución de hematoxilina de hierro. El mordiente y la tintura deberán ser utilizadas por la noche. Posteriormente se enjuagan las muestras en agua y se diferencian en una solución de sulfato férrico de amonio al 1% o ácido pícrico. Esta diferenciación deberá ser controlada a través de microscopio. En muestras bien diferenciadas, el núcleo es perfectamente visible, y el tejido circundante es teñido de azul acero. Luego se enjuaga con agua corriente por lo menos 2 horas, y se le agregan unas pocas gotas de amoníaco.

Se deshidratan las muestras en alcohol 70°, 96° y absoluto, y fenol-xileno. Se aclaran con xileno y se montan con bálsamo. Cuando las muestras están bien teñidas quedan de color azul oscuro a negro.

Apéndice IITinción con Giemsa para la demostración de parásitos en frotis
de sangre (modificado de Wiesman 1978)

1. Los frotis son secados y fijados en alcohol metílico por 1 minuto.
2. Se ajusta el pH de 100 ml de agua destilada a 7,2 con 0,1 mol de buffer de fosfato.
3. Se agrega 4 ml de solución de Romanowsky-Giemsa al agua neutra y se tiñen los frotis por 30 minutos.
4. Los frotis se lavan con agua destilada y se secan.
5. Se sumergen en aceite de inmersión y se examinan bajo microscopio.

Apéndice IIIPreparaciones de glicerol-gelatina

(Bauer et al 1973)

Se humedecen 7 g de gelatina por 2-3 horas en 42 ml de agua destilada, y se agregan 50 g de glicerol puro y 0,5 g de ácido ascórbico. Se calienta la mezcla en un baño de agua hasta que el líquido queda homogéneo. Luego se filtra y se enfría.

Estas preparaciones deberán ser selladas a todo lo largo del filo del cubreobjetos con barniz de asfalto, esmalte de uñas, poliesterol o parafina-colophony.

Apéndice IVTinción de platelmintos con hematoxilina ácida de Ehrlich

(Bullock 1978)

6 g hematoxilina
300 ml alcohol absoluto
300 ml agua destilada
300 ml glicerol
30 ml ácido acético glacial
alumbre de potasio en exceso.

La hematoxilina se disuelve en el alcohol antes de agregar otros ingredientes. La solución puede madurarse exponiéndola a la luz del sol en un envase por varias semanas; alternativamente, puede oxidarse en forma parcial agregándole 0,3 g de sodio yodado y sólo entonces queda lista para ser usada.

1. Bajar a agua
2. Teñir en hematoxilina de Ehrlich diluída (4 gotas en una caja de Petri con agua destilada)
3. Teñir toda la noche si fuera necesario
4. Lavar con agua
5. Deshidratar hasta alcohol 70°
6. Diferenciar en una solución al 0,1% de HCl y alcohol 70°
7. Azular en alcohol alcalino (una gota de amoníaco en alcohol 70°)
8. Deshidratar, aclarar y montar en bálsamo

Carmin de Gower (1978)

Agregar 10 g de carmín a 100 ml de ácido acético al 45% y llevar a punto de ebullición. Enfriar y filtrar. El residuo que queda en el papel se filtro es carmín acidificado. La solución para teñir se forma de la siguiente manera:

1 g de carmín acidificado
10 g de alumbre de potasio
200 ml de agua destilada

Mezclar, disolver por medio de calor y filtrar. Agregar un cristal de timol.

1. Bajar a agua y teñir
2. Diferenciar lentamente en ácido clorhídrico al 0,5% en alcohol 70° durante 1 a 12 horas, según lo requiera el tamaño del ejemplar.

Los ejemplares deberán ser deshidratados en alcohol 96° y absoluto. Además, Bauer et al 1973 recomendó aclararlos en aceite de clavo o aceite de Bergamot luego de la deshidratación. Luego se montan los parásitos en bálsamo.

Apéndice VEsquemas de procesamiento de tejidos en histopatología

(modificado según Bullock 1978)

Esquema A

1. Fijar el tejido
2. Lavar en H₂O, si se desea
3. Alcohol 70°, 4-8 horas
4. Alcohol 90°, 4 horas o toda la noche
5. Alcohol absoluto I, 2 horas
6. Alcohol absoluto II, 3 horas
7. Alcohol absoluto III, 3 horas
8. Cloroformo, toda la noche
9. Xilol I, 1/2 hora
10. Xilol II, 1/2 hora
11. Parafina I, 2 horas
12. Parafina II, 2 horas
13. Parafina III, 2 horas

Esquema B (procesamiento manual rápido)

1. Fijar en líquido de Carnoy, 30-60 minutos
2. Alcohol absoluto I, 30 minutos
3. Alcohol absoluto II, 30 minutos
4. Alcohol absoluto III, 30 minutos
5. Xileno, hasta que el tejido quede transparente
6. Parafina I, 30 minutos
7. Parafina II, 30 minutos
8. Parafina III, 30 minutos

Apéndice VIFórmula de hematoxilina

(Bullock 1978)

Hematoxilina de hierro de Lendrum

1. Disolver 1 g de hematoxilina en 100 ml de alcohol 95°
2. Disolver 10 g de cloruro de aluminio hidratado y 10 g de sulfato férrico hidratado en 100 ml de agua destilada
3. Combinar estas dos soluciones y agregar 2 ml de ácido clorhídrico concentrado y 2 ml o un poco menos de una solución de 9% de sodio yodado en agua
4. Mezclar y dejar reposar por 48 horas; ahora la solución está lista y con uso moderado permanecerá activa por alrededor de 2 meses. Podrá extenderse este período si se almacena la solución a 4°C.

La hematoxilina de hierro de Heidenhain aparece en el Apéndice I y la hematoxilina de alumbre de Ehrlich en el Apéndice IV.

Apéndice VIITinción con hematoxilina y eosina para histología general

1. Lavar las secciones con agua corriente, remover precipitaciones de mercurio si fuera necesario.
2. Teñir con hematoxilina durante 5-20 minutos, dependiendo de la tintura que se utilice (se recomienda la hematoxilina de Lendrum).
3. Lavar en agua corriente por 2 minutos.
4. Diferenciar en 0,5% alcohol ácido por algunos segundos. Verificar el nivel de diferenciación bajo microscopio.
5. Si los núcleos están suficientemente teñidos, azular en sustituto de agua corriente de Scott (ver más adelante) durante 5 minutos o como alternativa, en 2% de acetato de potasio (si se utiliza la hematoxilina de Lendrum) durante 5 minutos.
6. Lavar las secciones en H₂O.
7. Teñir en 1% de eosina alcohólica durante 3-5 minutos.
8. Retirar el exceso de eosina enjuagando las secciones en alcohol absoluto.
9. Verificar la tinción con eosina y si fuera satisfactoria, aclarar en xileno.
10. Montar en un medio de resina sintética.

Resultados: Núcleos azules; citoplasma, tejidos conjuntivos, células de sangre y músculos: rojo/rosado.

Sustituto de agua corriente de Scott (STWS)

3.5 g bicarbonato de sodio
25 g sulfato de magnesio
1000 ml agua destilada

Se agregan algunos cristales de timol a fin de prevenir el crecimiento de hongos y bacterias.

Apéndice VIIIAcido periódico de Schiff con tartracina en celulosa para
la demostración de carbohidratos

1. Desparafinar y lavar las secciones con agua corriente.
2. Oxidar en 1% de ácido periódico acuoso durante 5-10 minutos.
3. Lavar bien las secciones con agua corriente.
4. Colocar en el reactivo de Schiff durante 30 minutos.
5. Enjuagar rápidamente en agua destilada y luego lavar bien en agua corriente.
6. Teñir las secciones con la hematoxilina elegida.
7. Lavar en agua corriente.
8. Diferenciar en 0,5% de alcohol ácido durante algunos segundos.
9. Lavar en agua corriente.
10. Azular en STWS o en 2% de acetato de potasio, si se utiliza la hematoxilina de Lendrum.
11. Lavar en agua corriente.
12. Teñir con 1% de tartracina en celulosa durante 15-20 minutos.
13. Deshidratar en alcohol y aclarar en xileno.
14. Montar en un medio sintético.

Resultados: Núcleos: azul; citoplasma, tejido conjuntivo, músculo: amarillo; sustancias PAS positivas: rojo.

Este método resulta particularmente útil para el estudio de mucopolisacáridos en las estructuras integumentarias de peces y demuestra la presencia de glucógeno si se utiliza asociado con el agente de fijación de Gendre.

Apéndice IXReactivo de Feulgen para la demostración de DNA

El líquido de Bouin no es recomendado como un agente de fijación para este método debido a que ocasiona una hidrólisis excesiva. La duración óptima del ácido varía con los agentes de fijación utilizados.

1. Desparafinado y lavado de agua destilada.
2. Enjuagar rápidamente en NHCl frío y transferir a NHCl a 60°C para obtener un tejido óptimo (ver más abajo). Nota: Las secciones deberán estar firmemente unidas a los portaobjetos con una sustancia adhesiva de otra forma podrían ocurrir pérdidas debido al HCl (ácido clorhídrico).
3. Colocar una sección de control en agua destilada a 60°C por la misma cantidad de tiempo.
4. Lavar las secciones en agua destilada.
5. Colocar en reactivo de Schiff por 30-60 minutos.
6. Enjuagar rápida y profundamente en agua destilada.
7. Lavar en agua corriente.
8. Teñir en solución acuosa de verde brillante al 1% durante 1 minuto.
9. Deshidratar en alcohol, aclarar en xileno.
10. Montar en un medio de resina sintética.

Resultados:

DNA: rojo; Citoplasma: verde.

NOTA: La sección de control deberá ser negativa. Cualquier reacción positiva indica que hay presentes aldehidos libres antes de la hidrólisis.

Este método resulta particularmente útil para la demostración de linfocitos debido a la gran cantidad de DNA intracelular presente en estas condiciones.

Tiempos óptimos de hidrólisis luego de la fijación utilizando 1 N ácido clorhídrico a 60°C.

Formalina 8 minutos

Helly 8 minutos

Susa 18 minutos

Zenker 5 minutos

Apéndice XVan Gieson

Esta tintura es utilizada para tejidos colágenos y para histología general.

1. Desparafinar y lavar en agua corriente las secciones.
2. Teñir el núcleo con hematoxilina de hierro.
3. Lavar bien en agua corriente.
4. Diferenciar si fuera necesario con 1% alcohol ácido.
5. Azular en agua corriente o STWS.
6. Teñir en la solución de van Gieson (solución acuosa saturada de ácido pícrico 100 ml y 1% Fuccina ácida 10 ml) por 2-5 minutos.
7. Enjuagar rápidamente en agua destilada a fin de diferenciar la fuccina. No lave las secciones en agua corriente alcalina que puede extraer la fuccina.
8. Deshidratar en alcohol 95° e inmediatamente después en absoluto.
9. Aclarar en xileno.
10. Montar en un medio de resina sintético.

Resultados:

Núcleo: azul; músculo, citoplasma y células de sangre: amarillo;
Colágeno: rojo.

Apéndice XITinción de Giemsa

Esta tintura es usada para la demostración de quistes de Metacecarias.

1. Desparafinar y lavar con agua corriente las secciones.
2. Teñir en una solución diluída de Giemsa (4 ml de tintura en 100 ml agua destilada neutra) por 24 horas.
3. Enjuagar rápidamente en agua destilada.
4. Diferenciar rápidamente en 0,5% ácido acético hasta que la sección queda rosada.
5. Enjuagar en agua destilada. Seque la sección con papel de filtro.
6. Deshidratar rápidamente en alcohol absoluto. Aclarar con xileno.
7. Montar en un medio de resina sintética.

Resultados:

Núcleo: rojo oscuro; parásitos: azul/rojo; células de sangre: rosado.

Apéndice XIIFormulario para los resultados de disecciones de peces

(modificado según Reichenbach-Klinke 1975)

DIAGNOSTICO:

N° DE HOJA: FECHA: PROCEDENCIA:

ESPECIE:

SEXO: LONGITUD: PESO: EDAD:

EXTERIOR:

lesiones	cambios cutáneos
cicatrices	cuerpo hinchado
absesos	ectoparásitos
exoftalmos	tumoración
ojos hundidos	hongos

INTERIOR:

branquias	corazón
celoma	cerebro
hígado	músculos
intestino	esqueleto
riñones	testículo
bazo	ovario
vejiga natatoria	sangre

Cultivos

Fijación de órganos

OBSERVACIONES:
