

Ictiohistologia



Prof. Carina Ladeira

Abril 2008

Pertinência da Ictiohistologia

- ❑ No meio natural os recursos pesqueiros começam a escassear → necessidade de preservação
- ❑ A aquacultura surge da obrigação dos parceiros económicos a manter um nível de capturas próximo de zero, preservação dos recursos marinhos e reparação das espécies em perigo de extinção

Pertinência da Ictiohistologia

- Permite a utilização das técnicas de AP no estudo da patologia e fisiologia ictiológica, do estudo dos recursos naturais na alimentação humana com a aquicultura e ainda estudos ecológicos e de impacto ambiental, nomeadamente na gestão ambiental e na protecção de espécies ameaçadas de extinção

Técnicas de AP aplicadas na Ictiologia

- ❑ Técnicas histológicas de rotina (fixação, processamento e coloração)
- ❑ Técnicas complementares de Imunocitoquímica, Técnicas histoquímicas, Biologia Molecular e Genética (sobretudo na investigação evolutiva e no mapeamento de genomas)
- ❑ A maioria dos estudos tem sido direccionada para a detecção, desenvolvimento e virulência de agentes patogénicos e efeitos de agentes poluentes na etiologia

Pertinência da Ictiohistologia

- ❑ Em Portugal, a Ictiohistologia está ao dispor da Biologia Marinha e Pesqueira com uma focalização particular em estudos de maturação gonadal e ontogenia ictiológica, direccionados para a gestão dos recursos piscatórios, cada vez mais escassos e com uma importância claramente significativa para a população humana
- ❑ Para o desenvolvimento deste tipo de estudos, a técnica histológica é um campo importante uma vez que permite detectar condições muitas vezes subtis ou sinais iniciais de patologia irreconhecíveis no exame macroscópico

Espécies de aquacultura

- *Sparus aurata* (Dourada)
- *Dicentrarchus labrax* (Robalo)
- *Scophthalmus maximus* (Pregado)
- *Argyrosomus regius* (Corvina)
- *Solea solea* (Linguado)
- Moluscos bivalves: amêijoia e ostra

Aquacultura - desvantagens

- Artificialismo do regime de produção
- Reacção de stress pelo permanente contacto físico e pela competição pelo alimento



- Debilitação
- Aparecimento de doenças epidémicas

É necessário apostar na prevenção e no equilíbrio entre o meio ambiente, patogénios e peixe

Necrópsia



Preparação do peixe

- ❑ Peixe com sintomas
- ❑ Apanhá-lo rapidamente e com o mínimo stress possível
- ❑ Se uma população de peixes está infectada deve ser seleccionado o peixe mais debilitado
- ❑ Banho anestésiante (10 gotas de Koi Calm em 5L de água) – actuação em 7-15'

Banho anestésiante



Amostra de muco

- ❑ Utilizar luvas de plástico
- ❑ Retirar do banho e colocar em toalhas húmidas
- ❑ Cobrir a cabeça do peixe (diminuir a resposta fotofóbica)
- ❑ Se existir uma área óbvia de infecção fazer um *imprint*

Amostra de muco

- ❑ Se não existir uma lesão óbvia, deve ser colhida uma amostra geral
- ❑ Raspagem cuidadosa do tegumento, barbatanas e brânquias do peixe vivo



Processamento do muco

- ❑ Colocar em lâmina histológica com 1 gota de soro fisiológico a 0,6%
- ❑ Cobrir com lamela
- ❑ Observação ao microscópio (40-400X)



Patogénios

- Parasitoses
- Bacterioses
- Viroses
- Micoses

Parasitoses

- Um dos maiores problemas sanitários
- Danos: hemorragias, necrose, úlceras, asfixia, perturbações na natação, melanose (escurecimento do tegumento), entre outros
- Podem ser ectoparasitas e endoparasitas

Ectoparasitas

- ❑ Localizam-se à superfície do corpo ou em cavidades em contacto com o meio ambiente, como as cavidades branquiais
- ❑ Os ectoparasitas abandonam o hospedeiro quando morto
- ❑ Para identificação dos ectoparasitas faz-se uma raspagem do tegumento, barbatanas e brânquias do peixe vivo

Ectoparasitas ciliados



Trichodina spp.



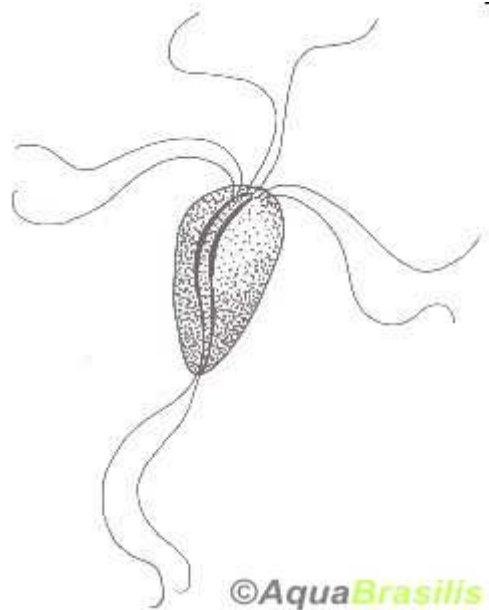
Uronema sp.

Ectoparasitas Flagelados



Ichthyobodo necator

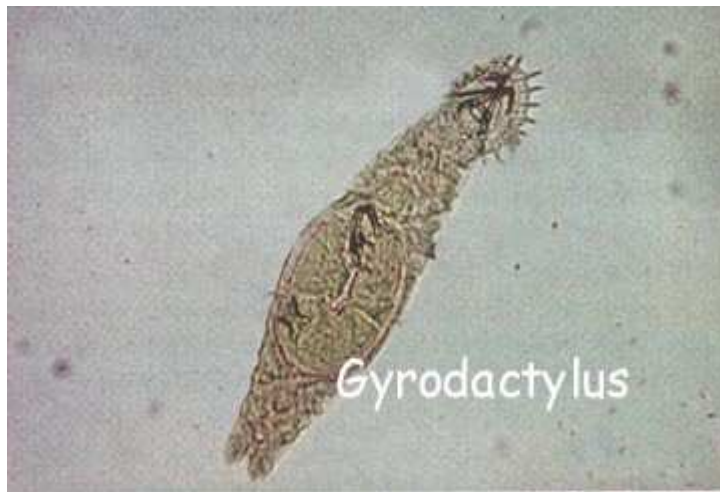
Ectoparasitas protozoários



Hexamita spp

Protozoário
hexamitídeo típico
8 pares de flagelos

Ectoparasitas platelmintas

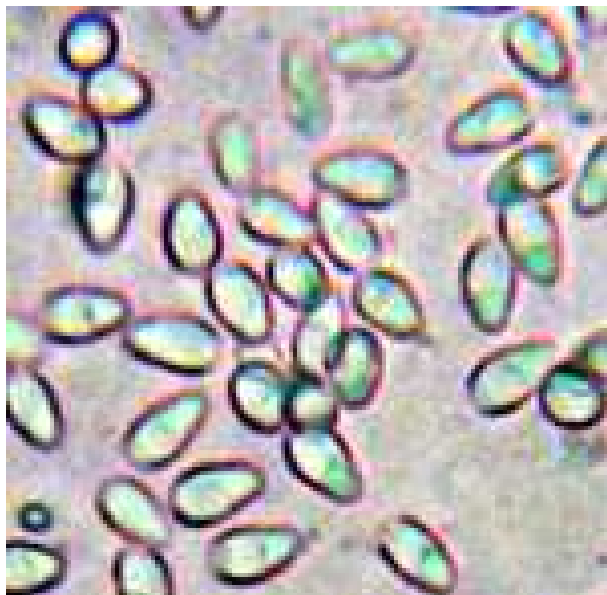


Gyrodactylus spp.

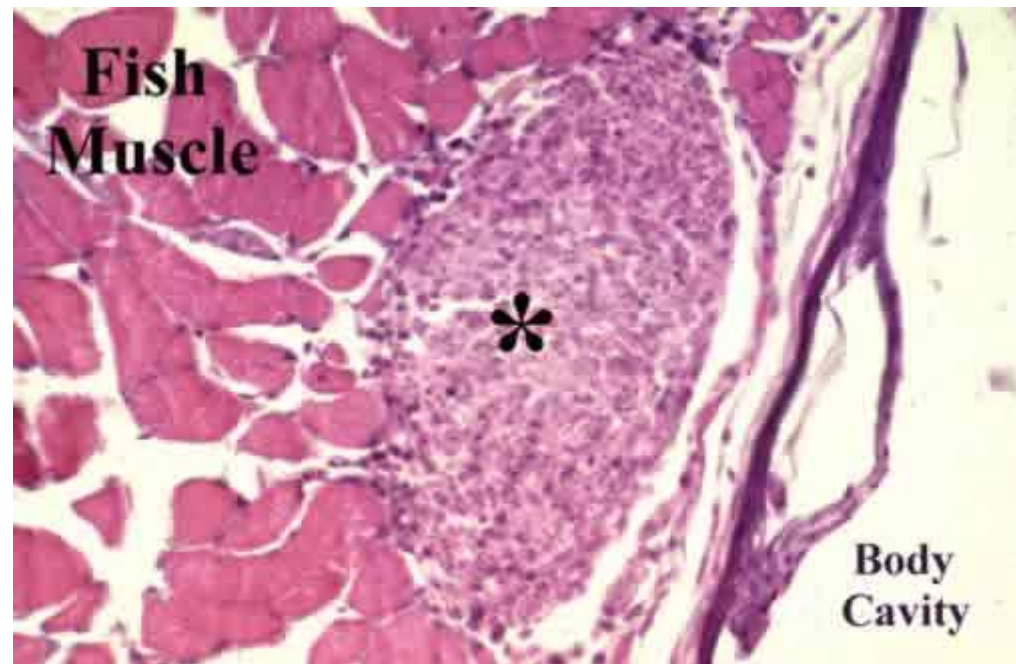
Endoparasitas

- ❑ Localizam-se dentro do hospedeiro, em qualquer órgão, tecido ou célula
- ❑ Em piscicultura podem ocorrer mortalidades muito elevadas devido à proliferação e facilidade de transmissão dos parasitas

Endoparasitas

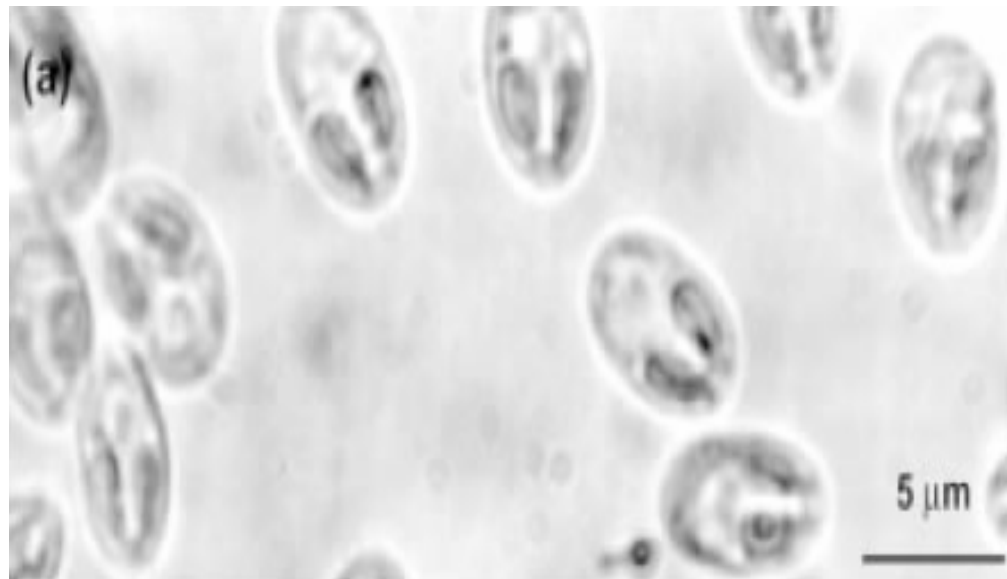


Microesporídeos



Quisto no tecido muscular com microesporídeos

Endoparasitas



Mixobolus cerebralis

Endoparasitas - processamento

- Observação em preparações histológicas
- Observação a fresco



Dissecação do peixe
Exame macroscópico dos órgãos
Abertura do tubo digestivo
Raspagem para lâmina histológica

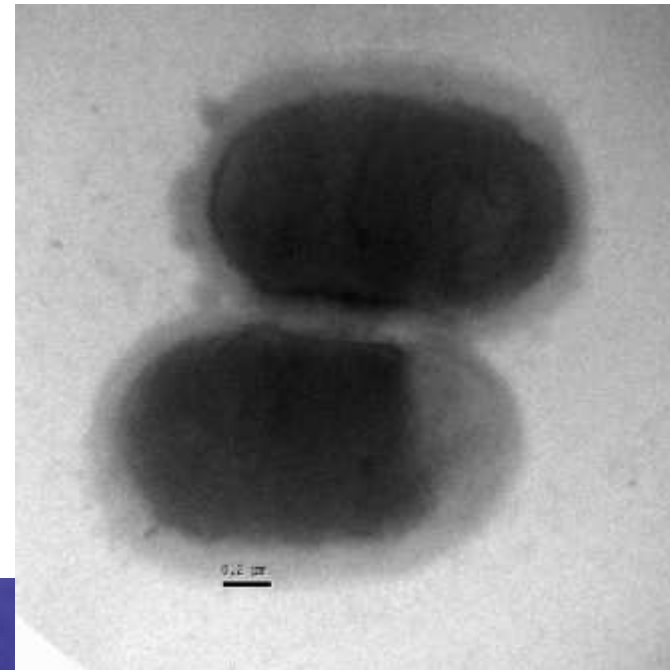
Bacterioses

- ❑ Mais de 20 géneros de bactérias são causadores de doenças em peixes e outros animais aquáticos
- ❑ A maioria das bactérias encontra-se no meio aquático, marinho e águas doces ou habita o corpo dos peixes e outros animais aquáticos
- ❑ Um peixe ou população piscícola “stressados” estão mais expostos à infecção bacteriana

Bacterioses

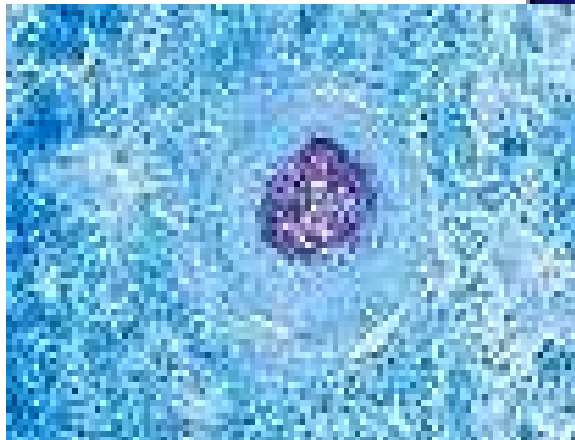
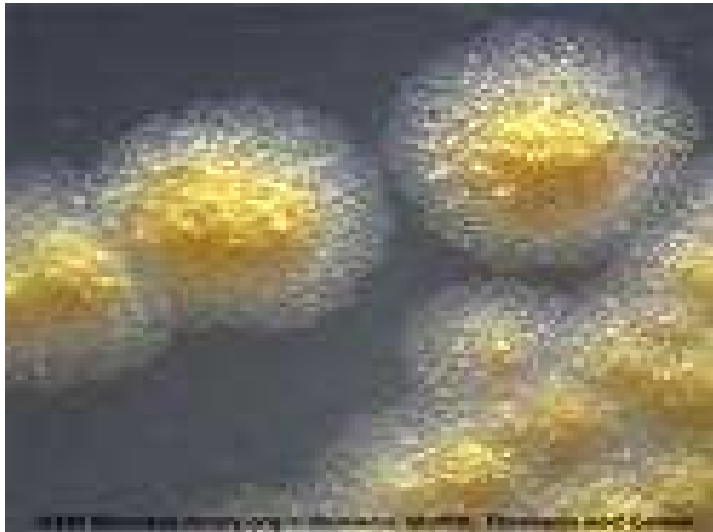
- Em Ictiopatologia consideram-se os seguintes 3 grupos de bactérias causadoras de doenças em peixes:
 1. **Agentes primários de doença:** causadores de doença sem “stress” aparente

Agentes primários de doença



*Aeromonas
salmonicida*

Agentes primários de doença

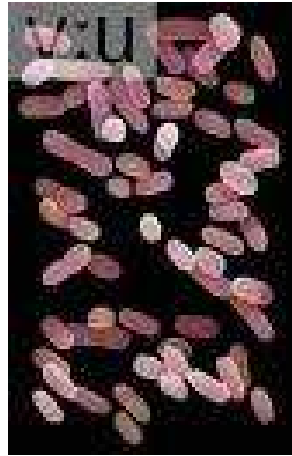


*Mycobacterium
marinum*

Bacterioses

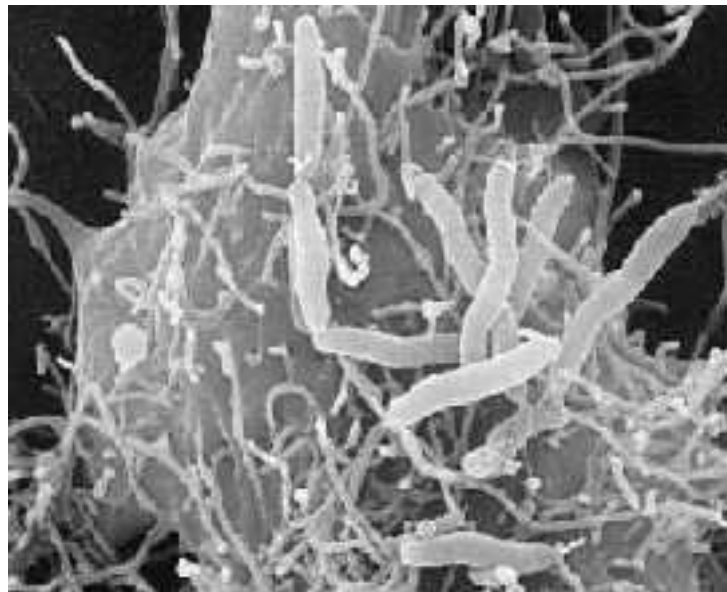
- 2. Patogénios secundários:** causam doença em peixes debilitados, por exemplo, a seguir a manipulações traumáticas

Patogénios secundários



Flavobacterium

Patogénios secundários



Aeromonas

Patogénios secundários



Pseudomonas

Bacterioses

- 3. Bactérias saprófitas:** multiplicam-se no hospedeiro moribundo, acelerando a sua morte, ou então invadem-no *post mortem*; Não são consideradas patogénicas por si só

Identificação de bactérias ícticas

- **Meios de cultura usados em veterinária**
- **Gerais** – meios nutritivos que proporcionam o crescimento a todas as estirpes bacterianas
- **Selectivos** – meios nutritivos que proporcionam o crescimento de estirpe bacteriana pretendida

Pesquisa de bactérias

Rim, fígado e baço do peixe, mas em vivo (anestesia), para meios de cultura gerais



Incubação na estufa (22-25°C)



Crescimento de colónias



Replicação para novos meios



Culturas puras

Só a partir de culturas puras se pode proceder à identificação das estirpes bacterianas

Viroses

- Transmissão de viroses ícticas entre animais
- **Transmissão horizontal** - pele, brânquias, tubo digestivo, aparelho genital e globo ocular, entre pares
- **Transmissão vertical** – de pais para filhos

Viroses

- ❑ Detectados cerca de 60 vírus diferentes, a maioria não está associada a doença
- ❑ Estão relacionadas com: grandes cargas, manejo deficiente e não cumprimento de regras de higiene sanitária
- ❑ Doenças problemáticas porque não se dispõe de tratamento antiviral

Viroses



Vírus da septicémia hemorrágica (VHS)

Micoses

- ❑ Pequeno número de fungos com valor ictiopatógeno
- ❑ Saprófitas que se comportam como patógenos oportunistas quando se degradam as condições ambientais ou os peixes se encontram debilitados e com lesões cutâneas

Micoses

□ Causas predisponentes:



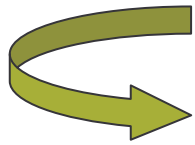
Presença abundante de matéria orgânica

Carga animal (peixes ou ovos) excessiva

Persistência na água de peixes ou ovos mortos que o fungo invade rapidamente

Prevenção como necessidade primária

- Monitorização de todos os parâmetros da água:



pH

Salinidade

Temperatura

Oxigénio dissolvido

Metais pesados

Entre outros

Técnica Ictiohistológica



Fixadores em Ictiohistologia

- ❑ Soluções tamponadas de Formaldeído
- ❑ Misturas fixadoras à base de formol (Formol Salino)
- ❑ Duboscq-Brasil
- ❑ Bouin
- ❑ Glutaraldeído
- ❑ Paraformaldeído

Exame Macroscópico

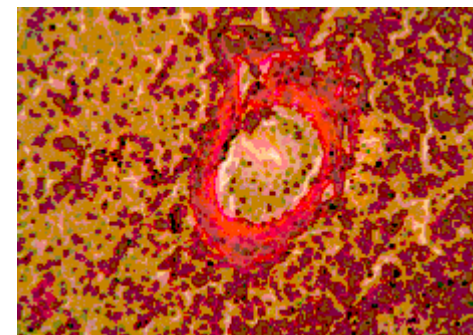
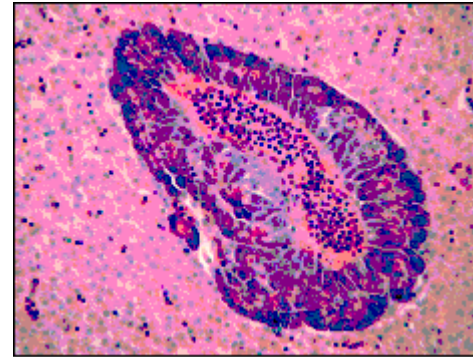
- ❑ O tecido de peixes decompõe-se mais rapidamente que tecido de outros animais (uma vez que apresentam uma flora saprófita abundante) torna-se muito importante que o procedimento da necrópsia decorra rapidamente após o sacrifício do animal
- ❑ Os tecidos colhidos para exame histológico devem ser representativos das lesões e devem também incluir zonas de tecido normal
- ❑ Estes tecidos não devem ser congelados antes da fixação

Processamento, Inclusão e Coloração

- ❑ Os estudos realizados até à actualidade utilizam todas as etapas do processamento histológico comum, isto é:
 - ❑ Desidratação em etanol
 - ❑ Diafanização em xilol
 - ❑ Impregnação e inclusão em parafina
 - ❑ Coloração H&E

Exame Microscópico

- ❑ As alterações celulares nos tecidos patológicos são, geralmente, características de uma doença ou grupo de doenças
- ❑ Os tecidos autolisados não têm qualquer tipo de valor no exame histopatológico



Resumo

- Pertinência da Ictiohistologia
- Necrópsia
- Técnica Ictiohistológica