

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA

Determinación de Yersinia Ruckeri y sus características lesionales anatomo - histopatológicas en truchas Arco Iris (Oncorhynchus mykiss) en etapa pre-comercial en una piscigranja de la región Junín.

TESIS

Para optar el Título Profesional de: Médico Veterinario

AUTOR

Carlos Alberto Fernandez Nuñez

Lima – Perú

2011

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a mis padres Leandra (QEPD) y Rodrigo por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos Dante y Jimena por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

Mis sobrinos Rodrigo y Camila, para que vean en mi un ejemplo a seguir.

Al amor de mi vida Sandra, por estar siempre a mi lado, brindándome todo su amor, entrega, dedicación y sobre todo tenerme mucha comprensión y paciencia durante estos años de mi vida y quien ha sido una pieza clave en mi desarrollo profesional y personal. Mil gracias porque siempre estas a mi lado sin condiciones Dita de mi vida, sin ti nada de esto hubiese sido posible te amo

AGRADECIMIENTOS

Para la elaboración y culminación de esta tesis he tenido el apoyo de muchas personas amables que me apoyaron desinteresadamente a cumplir con esta meta por ello mi eterno agradecimiento con ellos.

Mi profundo agradecimiento a la Dra. Nieves Sandoval Chaupe, por guiarme y asesorarme en toda la elaboración de mi tesis y por haberme permitido trabajar con ella, con quien he aprendido muchas cosas que me han servido para crecer en lo profesional y en lo personal.

Agradezco también a mis revisores Dr. Alberto Manchego y la Dra. Débora Alvarado quienes se dieron un tiempo para poder revisar y corregir mi trabajo, al Jurado Examinador la Dra. Olga Li, al Dr. Luis Tabacchi, al Dr. Arnaldo Alvarado por sus aportes, muchas gracias por ello.

También quiero agradecer a mi amigo Chen Bueno por su apoyo incondicional en la elaboración de esta tesis, pero principalmente por su gran aporte científico en su condición de microbiólogo, gracias por enseñarme y ayudarme a entender más el mundo de las bacterias, he aprendido cosas nuevas y me ha servido mucho en mi vida profesional.

Gracias también a todos mis compañeros del laboratorio de Ictiopatología, que me brindaron su apoyo y su amistad sincera, con quienes he compartido innumerables horas de trabajo.

Gracias Tía María, tus cafés me ayudaron mucho.

Finalmente gracias a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto en mi vida y haberme dado salud para lograr hacer realidad este sueño.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Situación actual de la acuicultura.....	3
2.2 Trucha arcoíris.....	5
2.3 Yersiniosis.....	7
2.4 Aspecto epidemiológico.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Lugar de estudio.....	16
3.2. Animales y muestras.....	16
3.3. Metodología.....	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Análisis de agua.....	18
4.2 Examen de necropsia.....	18
4.3 Análisis Anatomohistopatológico.....	22
5. DISCUSIÓN.....	37
6. CONCLUSIONES.....	41
7. BIBLIOGRAFÍA.....	42
8. ANEXOS.....	50

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el determinar la presencia del agente *Yersinia ruckeri* en la piscigranja “El Edén” y el de identificar y clasificar las lesiones anátomo histopatológicas en tejidos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de la piscigranja “El Edén”, ubicada en la provincia Concepción a 3400 m.s.n.m. en la Región Junín. A partir de los órganos cultivados se logro aislar 11 cepas Gram negativas, 9 cepas perteneciente a las enterobacterias, de las cuales 3 fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas como *Yersinia ruckeri* y fueron similares a las reportadas por primera vez en Idaho.

Como lesiones macroscópicas se pudo observar exoftalmia unilateral 8/30 (26.66%), melanosis 4/30 (13.33%), hígado pálido 18/30 (60.00%), hígado congestionado 3/30 (10.00%), hígado con petequias 15/30 (30.00%), branquias pálidas 4/30 (13.33%), branquias hiperemias 9/30 (30%) y del estudio hiatopatologico se evidenció congestión en bazo 14/30 (46.66%), hiperplasia del ápice de las branquias 12/30 (40.00%), hiperplasia de vellosidades del ciego 5/30 (16.66%), esporas de ictiofonus en corazón 6/30 (20.00%), necrosis en mucosa estómago 4/30 (13.33%), congestión hepática 4/30 (13.33%), hiperplasia en mucosa del intestino delgado 9/30 (38.88%) y regeneración tubular renal 9/30 (30%).

Se aislaron cepas de *Y. ruckeri* y las lesiones en tejidos son compatibles con su infección sin embargo la frecuencia de su aislamiento es baja y existen otras bacterias diferentes a las enterobacterias que han sido aisladas incluyendo bacteria Gram positivas y que no sabemos que rol cumplen en la enfermedad de la trucha arcoíris.

Palabras clave: *Yersinia ruckeri*, anátomo histopatológico, trucha arcoíris, enfermedad de la “boca roja entérica”.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the presence of the agent *Yersinia ruckeri* in fish farm "Eden" and to identify and classify anatomical histopathological lesions in tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of fish farm "El Eden" located Conception in the province at 3400 m. in Junín region. From the cultured organs was isolated 11 strains gram negative, 9 strains belonging to the Enterobacteriaceae, of which 3 were characterized by biochemical tests as *Yersinia ruckeri* and were similar to those reported for the first time in Idaho.

As was observed macroscopic lesions unilateral exophthalmos 8/30 (26.66%), melanosis 4/30 (13.33%), liver pale 18/30 (60.00%), liver congested 3/30 (10.00%), liver petechiae 15 / 30 (30.00%), pale gills 4/30 (13.33%), gills hyperemic 9/30 (30%) and the study evidenced histopathological spleen congestion in 14/30 (46.66%), hyperplasia of the apex of the gills 12 / 30 (40.00%), cecal villus hyperplasia 5/30 (16.66%), heart spores ictiofonus in 6/30 (20.00%), stomach mucosa necrosis in 4/30 (13.33%), hepatic congestion 4/30 (13.33%), hyperplasia in the small intestinal mucosa 9/30 (38.88%) and renal tubular regeneration 9/30 (30%).

Strains were isolated from *Y. ruckeri* and tissue injuries are consistent with infection however the frequency of isolation is low and there are different from other bacteria that have been isolated Enterobacteriaceae bacteria including Gram positive and do not know what role they play in disease of rainbow trout.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, anatomical and histopathological, rainbow trout, disease of "enteric red mouth"

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Producción y utilización de pesca y la acuicultura en el mundo. Información obtenida de la FAO, 2010.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la trucha arcoíris. Información obtenida de FishBase, basado en la publicación de Smith G. 1989.

Cuadro 3. clasificación Taxonómica de la bacteria *Yersinia ruckeri*

Cuadro 4. Parámetros de la calidad de agua

Cuadro 5. Lesiones Macroscópicas de las muestras

Cuadro 6. Frecuencia de lesiones histopatológicas del Bazo.

Cuadro 7. Frecuencia de lesiones histopatológicas de las Branquias.

Cuadro 8. Frecuencia de lesiones histopatológicas de los Ciegos Pilóricos.

Cuadro 9. Frecuencia de lesiones histopatológicas del Corazón.

Cuadro 10. Frecuencia de lesiones histopatológicas del Estómago.

Cuadro 11. Frecuencia de lesiones histopatológicas del Hígado.

Cuadro 12. Frecuencia de lesiones histopatológicas del Intestino.

Cuadro 13. Frecuencia de lesiones histopatológicas de la Piel.

Cuadro 14. Frecuencia de lesiones histopatológicas del Riñón.

Cuadro 15. Aislamiento bacteriano según órgano

Cuadro 16. Cantidad de bacterias Gram positivas y negativas

Cuadro 17. Bacterias pertenecientes a la Familia *Enterobactereaceae*

Cuadro 18. Resultados Pruebas Bioquímicas.

Cuadro 19. Resultados Pruebas Bioquímicas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cosecha de recursos Hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura, 2000-2009. Información obtenida del Ministerio de la Producción.
- Figura 2.** Hígado con petequias y Esplenomegalia.
- Figura 3.** Exoftalmia
- Figura 4.** Lesión Tegumentaria
- Figura 5.** Melanosis de piel, retraso en el crecimiento.
- Figura 6.** Hígado Pálido
- Figura 7.** Lesión de aleta Caudal, Branquias Hiperemicas.
- Figura 8.** Bazo: congestión esplénica.400x.
- Figura 9.** Branquias: Hiperplasia y fusión de lamelas .400x.
- Figura 10.** Microsporidium sp. en citoplasma del enterocito del ciego pilórico.400x.
- Figura 11.** Nótese el incremento del grosor del pericardio con infiltración de células inflamatorias evidenciando pericarditis.400x
- Figura 12.** Espora de ictiofonus en miocardio esponjoso del corazón. 400x.
- Figura 13.** CGE debajo de la submucosa del estomago.400x
- Figura 14.** Porción muscular del estomago con severa presencia de hifas de ictiofonus y evidente necrosis muscular.400x.
- Figura 15.** Hígado graso, obsérvese la imagen negativa de la grasa en citoplasma del hepatocito. 400x.
- Figura 16.** Granulomas en hígado con presencia de esporas de ictiofonus. 400x.
- Figura 17.** Fusión y atrofia de las vellosidades en intestino.400x.
- Figura 18.** Necrosis de fibras musculares lisas. 400x.
- Figura 19.** Gotas hialinas y necrosis de epitelio de túbulo renal. 400x.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Flujograma del Aislamiento de *Yersinia ruckeri*.

Anexo 2. Protocolo para el procesamiento de muestra para histopatología.

Anexo 3. Pruebas Bioquímicas.

Anexo 4. Lesiones de las truchas halladas en la necropsia.

LISTA DE ABREVIATURAS

CGE: Complejo granuloma eosinofílico.

CMM: Centro melanomacrofago.

ERM: del inglés "Enteric redmouth"

FAO: Organización para la agricultura y la alimentación.

H-E: Hematoxilina- Eosina.

PRODUCE: Ministerio de la Producción.

MR: Rojo de metilo.

OMPs: Proteína extracelular de membrana.

TSA: Agar tripticasa de soya.

TSI: Triple azúcar y hierro.

VP: Voges-Proskauer

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en nuestro país ha experimentado un significativo progreso en los últimos años constituyéndose en una actividad que se encuentra en constante crecimiento cuya principal especie cultivada es la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), logrando una producción de 1,857 TM en el año 2000 que ascendió a 6,997 TM en el año 2007, siendo los departamentos de Junín y Puno los principales centros de cultivo en nuestro país. (PRODUCE, 2008).

Hoy en día se conoce la presencia de diversas enfermedades infecciosas en nuestro territorio que afectan la producción acuícola, entre ellas la enfermedad entérica de la boca roja (Enteric Redmouth-ERM por sus siglas en inglés), la cual representa uno de los principales problemas sanitarios y económicos en las piscifactorías del Perú, sin embargo existe poca información sobre el desarrollo de esta enfermedad y otras presentes en la trucha arcoíris (Bravo y Kojagura, 2004).

La enfermedad de la boca roja es considerada una de las enfermedades más importantes en la industria acuícola de salmónidos (Akhlaghi y Sharifi, 2008). Esta enfermedad es causada por una bacteria gramnegativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, *Yersinia ruckeri*, está ampliamente distribuida en las diversas industrias salmónidas del mundo (Bravo y Kojagura, 2004; Evenhuis et al., 2009). Aunque la infección por este agente ha sido reportada en otras especies de peces, son los salmónidos, en especial la truchas arco iris, la especie más susceptible a la enfermedad de la boca roja (Furones et al., 1993).

La enfermedad de la boca roja se caracteriza por la presencia de zonas de congestión y hemorragia en diversos tejidos y órganos, particularmente en los intestinos y alrededor de la boca (Coquet et al., 2002), sin embargo, la presencia de estos signos no siempre están presentes en todos los animales enfermos (Troncoso et al., 1994). Su modo de transmisión es horizontal y se ha relacionado con peces portadores silvestres o de cría y otros vectores, como invertebrados acuáticos y aves (Coquet et al., 2002). Los brotes de enfermedades tienen relación con eventos de estrés, a pesar de haber poca información disponible acerca de los mecanismos de virulencia involucrados en la progresión de la enfermedad. (Secades y Guijarro, 1999).

Diversos estudios dejan de manifiesto que tanto la caracterización clínica como los análisis anatomopatológico son de ayuda relevante en el estudio de las patologías infecciosas de origen bacteriano en peces, pero no permiten dilucidar con certeza la etiología particular de un proceso de este tipo en estos hospederos, teniendo en cuenta además que estas etiologías resultan en cambios patológicos son muy semejantes y a menudo indistinguibles entre sí, por lo que se requiere de métodos microbiológicos para confirmar la presencia de los agentes (Troncoso *et al.*, 1994).

Yersinia ruckeri como especie perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es poco exigente por lo que su aislamiento es relativamente fácil de realizar. Esta bacteria puede crecer sin dificultad en varios medios de cultivo y con pruebas bioquímicas se puede llegar a un diagnóstico presuntivo confiable (Troncoso *et al.*, 1994). La confirmación de la presencia de *Yersinia ruckeri* requiere el aislamiento bacteriológico de bacterias gram-negativas, de motilidad positiva con características bioquímicas como las siguientes: citocromo oxidasa negativa, ácido a partir de glucosa (sin producción de gas), ornitina descarboxilasa y lisina descarboxilasa positivos, arginina dihidrolasa negativo, aglutinación positiva con suero conejo anti-*Y. ruckeri*, entre otras (Bullock *et al.*, 1978; Austin y Austin, 1999; Akhlaghi y Sharifi, 2008).

La mayoría de las investigaciones previas sobre la infección por *Yersinia* en varias especies de peces se basa generalmente en los hallazgos bacteriológicos de *Yersinia ruckeri*. Sin embargo, la investigación sobre los efectos patológicos de este agente en los peces es muy limitada (Avci y Birincioglu, 2005).

El empleo de métodos, como en el presente trabajo, así como el desarrollo de sistemas de diagnóstico rápido, implica que a futuro se pueda contar con datos epidemiológicos de gran utilidad para orientar el diagnóstico temprano de ésta y otras enfermedades bacterianas. Ello permitirá adoptar medidas de manejo profilácticas adecuadas y oportunas que reduzcan las mermas económicas que causan en la industria acuícola.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Situación Actual de la Acuicultura

La producción mundial de acuicultura reportó un crecimiento superior al 25% en los últimos 5 años, debido a la creciente demanda de este producto y a la disminución de los peces obtenidos por pesca (Cuadro 1) (FAO, 2010).

Cuadro 1: Producción y utilización de pesca y la acuicultura en el mundo. Información obtenida de la FAO, 2010.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<i>(Millones de toneladas)</i>						
PRODUCCIÓN						
CONTINENTAL						
Captura	8,6	9,4	9,8	10,0	10,2	10,1
Acuicultura	25,2	26,8	28,7	30,7	32,9	35,0
Total continental	33,8	36,2	38,5	40,6	43,1	45,1
MARINA						
Captura	83,8	82,7	80,0	79,9	79,5	79,9
Acuicultura	16,7	17,5	18,6	19,2	19,7	20,1
Total marina	100,5	100,1	98,6	99,2	99,2	100,0
TOTAL CAPTURA	92,4	92,1	89,7	89,9	89,7	90,0
TOTAL ACUICULTURA	41,9	44,3	47,4	49,9	52,5	55,1
TOTAL PESCA MUNDIAL	134,3	136,4	137,1	139,8	142,3	145,1
UTILIZACIÓN						
Consumo	104,4	107,3	110,7	112,7	115,1	117,8
Usos no alimentarios	29,8	29,1	26,3	27,1	27,2	27,3
Población (<i>miles de millones</i>)	6,4	6,5	6,6	6,7	6,8	6,8
Suministro per cápita de pescado comestible (<i>kg</i>)	16,2	16,5	16,8	16,9	17,1	17,2

A nivel internacional la producción de salmónidos alcanzó una cifra de 2 295 523 TM en el año 2008, de las cuales Noruega y Chile fueron los principales y mayores países productores, con 44% y 34% respectivamente. El año 2008 la producción de trucha arcoíris a nivel mundial mostró una cifra de 576 289 TM (FAO, 2010).

En el 2008, según informes de la FAO, sesenta y nueve países se dedican a la producción de trucha arcoíris pero muchos de estos en menor escala en comparación

a los principales centros de producción de trucha como Europa, Norteamérica, Chile, Japón y Australia (FAO, 2010).

En el Perú la acuicultura se ha venido incrementando en los últimos años, siendo el cultivo de trucha el que presenta el mayor crecimiento, principalmente en zonas altoandinas, cosechándose en el año 2009 más de 12 000 toneladas métricas (Figura 1); así mismo, las exportaciones de trucha se han venido incrementando, en el 2010 hasta el mes de noviembre ascendían a 685 toneladas métricas, siendo los principales países de destino Canadá, Noruega, Alemania, Estados Unidos y Suecia, realizándose principalmente en dos formas, la de filete y la de trucha entera (sin cabeza, sin vísceras) (PRODUCE, 2008). Las principales empresas dedicadas al cultivo de la trucha se encuentran en Puno (3 con 61.34 has) y Junín (2 con 3.93 has) (PRODUCE, 2008).

Existen otras especies producidas en zonas tropicales tales como la gamitana, paco y boquichico y finalmente la tilapia que es cultivada en la selva alta y en la costa norte del país (PRODUCE, 2008).

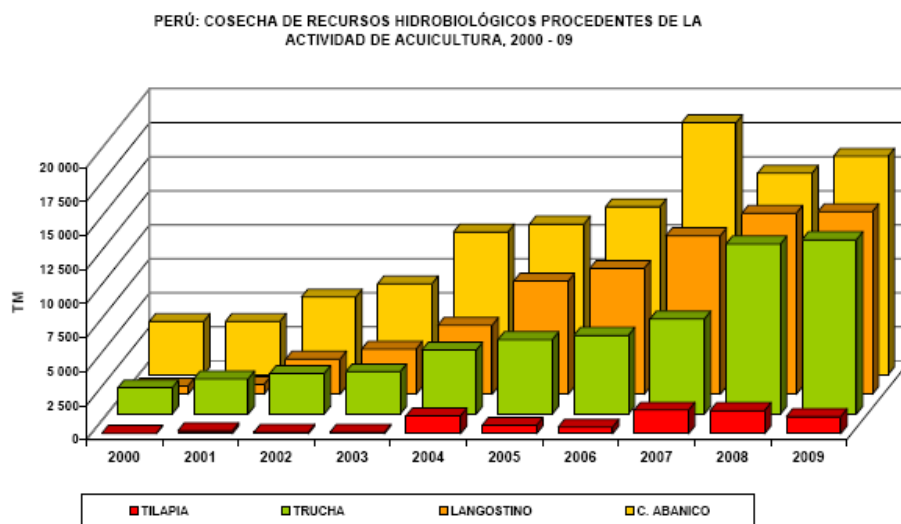


Figura 1. Cosecha de recursos Hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura, 2000-2009. Información obtenida del Ministerio de la Producción.

2.2. Trucha Arco Iris.

La trucha arcoíris es un pez resistente, fácil de desovar, de rápido crecimiento, tolerante a una amplia gama de ambientes y la manipulación. Los alevines pueden ser iniciados fácilmente a una alimentación con una dieta artificial. Puede ocupar diversos hábitats, desde un ciclo de vida anádromo (océano-agua dulce) hasta habitar solo en agua dulce (FAO, 2010).

La trucha arcoíris es nativa de las desembocaduras de los ríos en el Océano Pacífico en Norte América, desde Alaska hasta México. Desde 1874 se ha introducido a las aguas en todos los continentes salvo en la Antártida, con fines de pesca recreativa y de acuicultura (FAO, 2010). La pesca, así como el cultivo de trucha se practica en las cuencas continentales tropicales y sub tropicales de muchos países de Asia, Este de África y Sudamérica (Dill y Cordone 1997; FAO, 2010).

La trucha fue la primera especie en el desarrollo de la acuicultura peruana, es así que en 1982 se importaron 50 000 ovas embrionadas procedentes de los Estados Unidos, a un criadero particular de la Oroya (Godoy 2002).

2.2.1 Clasificación Taxonómica.

La clasificación taxonómica de la trucha arcoíris se presenta en el cuadro 2.

Cuadro 2: Clasificación taxonómica de la trucha arcoíris. Información obtenida de FishBase, basado en la publicación de Smith G. 1989.

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Género	Oncorhynchus
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	“trucha arcoíris”

2.2.2 Características Biológicas.

La forma del cuerpo es alargada y fusiforme con 60-66 vértebras. Presenta una aleta adiposa, por lo general con borde negro. Coloración azul a verde oliva por encima de una banda de color rosa a lo largo de la línea lateral y cola plata por debajo. Tanto en el dorso como en los flancos, en la cabeza y aletas se encuentran cubiertos de pequeños puntos negros. La Coloración varía con el hábitat, tamaño y condición sexual. Hay una tendencia en truchas de río y reproductores de ser más oscuras y presentar colores más intensos, mientras que las truchas de lago son más brillantes y de color plateado (FAO, 2010).

Pueden soportar una amplia gama de temperatura, desde 0 a 27 ° C, pero en las zonas de desove y el crecimiento se produce en una gama más reducida de 9 a 14 ° C. La temperatura del agua óptima para el cultivo de trucha arco iris está por debajo de 21 ° C. Como resultado, la temperatura y la disponibilidad de alimentos influyen en el crecimiento y desarrollo, haciendo que el tiempo para alcanzar la madurez varíe, aunque normalmente es de 3-4 años (FAO, 2010).

Las hembras son capaces de producir hasta 2 000 huevos /Kg de peso corporal. Los huevos son relativamente grandes en diámetro midiendo de 3 a7 mm. La mayoría de los peces desovan sólo una vez al año, en la primavera (enero a mayo en el hemisferio norte); aunque la crianza selectiva y el ajuste del fotoperiodo han desarrollado cepas de incubación que puede madurar antes y desovar durante todo el año. También se han obtenido características superiores de selección mediante hibridación, incrementando las tasas de crecimiento, resistencia a las enfermedades, y prolificidad, mejorando la calidad y sabor de la carne (FAO, 2010).

Las truchas no desovan naturalmente en los sistemas de crianza, por lo que los juveniles se obtienen de zonas de desove artificial en una incubadora o por recolección de huevos de poblaciones silvestres. Las larvas están bien desarrolladas a la eclosión. En la naturaleza, los adultos se alimentan de insectos terrestres y acuáticos, moluscos, crustáceos, huevos de peces y otros pequeños peces, pero lo más importante es la alimentación con camarones de agua dulce, que contiene los pigmentos carotenoides responsables de la coloración naranja-rosa de la carne. En la acuicultura, la inclusión de los pigmentos sintéticos como la astaxantina y cantaxantina en el alimento produce esta coloración (FAO, 2010).

2.3 Yersiniosis.

La yersiniosis o enfermedad de la boca roja, es una enfermedad infectocontagiosa, que puede ser de carácter crónico o agudo que afecta a una gran gama de peces, es causada por la bacteria gram-negativa *Yersinia ruckeri*. Está presente como portador en un gran número de especies, prácticamente indetectable que solo aparecerá en situaciones de estrés, particularmente asociado con sistemas intensivos de cultivo y mala calidad de agua, pudiendo resultar en grandes pérdidas económicas (Woo y Bruno, 1999).

El primer aislamiento de *Yersinia ruckeri* se realizó en el año 1952 en Idaho, Estados Unidos, y fueron descritos por Ross *et al*, 1966 y Rucker *et al*, 1966 y fue realizado en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En un comienzo se le denominó “redmouth” (boca roja), “redthroat” (garganta roja) y “bacterial septicaemia” (septicemia bacteriana), estos nombres derivaron de la sintomatología que en varios casos fueron causadas por infecciones mixtas con otros organismos gram-negativos. En otros casos, donde fue probada la infección exclusivamente por *Yersinia ruckeri*, no se observaron en todos los casos esta sintomatología (Woo y Bruno, 1999; Tobbach, 2009).

Se estandarizó en 1975 el nombre de “redmouth”, por la “Fish Section of the American Fisheries Society” (Sección de peces de la Sociedad Americana de Pesca), pero actualmente el nombre más usado por los científicos es el de yersiniosis (Woo y Bruno, 1999).

La ubicación taxonómica en el género *Yersinia* de este agente fue también problemática, pero hasta hoy se le confiere esa ubicación (Ewing *et al.*, 1978).

Desde que fue aislada en 1952, la yersiniosis se ha extendido y ha sido aislada en poblaciones salvajes de peces de agua dulce de Europa, África, Norteamérica, Sudamérica, Asia y Australia. Puede ser controlada por medio de un manejo aceptable, particularmente, calidad de agua; además, responde bien a antibióticos y vacunas. A pesar de esto, el constante tratamiento contra esta enfermedad y los costos de los procedimientos de manejo resultan en pérdidas económicas para los

acuicultores, sobre todo en las regiones donde es endémica (Woo y Bruno, 1999; Tobback, 2009).

Si bien esta enfermedad ha sido descrita para diversas especies de peces, los salmónidos y en especial la trucha arcoíris son las especies más susceptibles (Furones *et al*, 1993).

2.3.1 Antecedentes históricos.

En 1966 en Idaho, USA, se describe por primera vez una bacteria asociada a la enfermedad de la boca roja, una bacteria Gram negativa, con flagelos peritricos, la cual se aislaron a partir de tejido de riñón de truchas “arco iris” (*Salmo gairdneri*) afectados por la enfermedad. A pesar que las bacterias parecían miembros de la familia Enterobacteriaceae, era muy difícil determinar con exactitud la posición taxonómica dentro de la familia. Por ello temporalmente se le designo como bacteria de la boca roja usada para denominar la enfermedad de la boca (Ross *et al*, 1966).

2.3.2 Etiología.

Originalmente los diferentes serotipos de *Yersinia ruckeri* fueron asociados con la capacidad de los aislados de fermentar el sorbitol. Por muchos años después del aislamiento original de *Yersinia ruckeri* de salmónidos en Idaho, todos los aislados fueron serológicamente similares y no fermentaban sorbitol (Ross *et al*, 1966; Busch, 1983). Todos ellos fueron denominados Tipo I, pero más adelante muchos aislados de *Yersinia ruckeri* no fermentadores del sorbitol fueron conformando distintos serotipos (Pyle *et al*, 1985).

La serotipificación luego fue formando diferentes esquemas identificando seis serotipos, denominados como serotipos de Hagerman, la mayoría de los cuales, brotes naturales de trucha arco iris y los peces enfermos son causados por el serovar I, cepa Hagerman (McCarthy y Johnson, 1982). Algunos aislamientos de Australia de *Y. ruckeri* que tuvieron reacción cruzada con el serovar I se les denominó serotipo I'. El serovar II puede ser significativo cuando se asocia con la “boca roja entérica” en el salmón Chinook (Cipriano *et al.*, 1986). El serovar III se encuentra en Australia. En un principio se sugirió que la fermentación del sorbitol estaba asociada a la

patogenicidad; sin embargo este indicador no es un factor fiable de virulencia (Stevenson y Airdrie 1984; Cipriano et al, 1986).

2.3.3 Taxonomía.

Yersinia ruckeri es una enterobacteria (Cuadro 3) Gram-negativa responsable de la enfermedad de la Boca Roja, infección septicémica de curso agudo a crónico que afecta a salmónidos, causante de una alta mortalidad y elevadas pérdidas económicas en piscifactorías, especialmente en trucha arco iris y en salmón atlántico (Ewing et al. 1978).

Cuadro 3: clasificación Taxonómica de la bacteria *Yersinia ruckeri*.

Clasificación	Taxonómica
Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	Yersinia
Especie	<i>Yersinia ruckeri</i>

2.3.4 Características de *Yersinia ruckeri*.

Las colonias cultivadas generalmente en TSA (agar tripticasa de soja) presentan características como; colonias de 1 a 2 mm, redondas, lisas, ligeramente convexas y con bordes completos, dichas colonias no presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta, pero pueden aparecer ligeramente iridiscentes al reflejo de la luz. A la luz natural son translucidas con un color blanco cremoso, presentando muchas veces un olor característico y único entre las bacterias que afectan a los peces (Busch y Lingg, 1975; Austin *et al.*, 1982; Busch, 1982; Furones *et al.*, 1993).

Yersinia ruckeri, es un bacilo Gram negativo corto (1.5-2.0 μm por 0,5 μm) que se observa sólo o asociado en pequeñas cadenas. Estudios con hibridación de ADN y

determinación de la relación citocina - guanina confirman que el microorganismo pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Bullock *et al.*, 1978; Austin *et al.*, 1982).

Yersinia ruckeri es un anaerobio facultativo, pudiendo crecer en condiciones aerobias como anaerobias, en cualquiera de los medios primarios enriquecidos, dentro de un rango de pH que varía de entre 6.5 a 7.7, en un tiempo de entre 12 y 96 horas (Amend *et al.*, 1983). Con relación al crecimiento de *Yersinia ruckeri* en otros tipos de medios como el agar Mac Conkey, agar Samonella Shigella, agar bilis Verde Brillante y Bilis Verde Brillante enriquecido con selenito, se determinó que el 100% crece en agar Mac Conkey, el 88 % en agar Samonella Shigella, el 56 % en agar bilis Verde Brillante y no crece en agar Bilis Verde Brillante enriquecido con selenito (Ewing *et al.* 1978). Por otra parte, presenta flagelación peritrica que le confiere a *Y. ruckeri* la característica de motilidad, que está relacionada con la temperatura de incubación. Es así como son móviles aquellas cultivadas entre 18 a 27 °C. A 9 °C los flagelos están presentes pero no son funcionales, y encontrándose totalmente atenuados a 35°C con completa pérdida de motilidad. Cabe mencionar además, que la temperatura óptima de crecimiento para esta bacteria se encuentra entre los 22 y 25°C (O'Leary *et al.*, 1979; Furones *et al.*, 1993).

Bioquímicamente, *Yersinia ruckeri* se describe como un grupo homogéneo en sus características. Es un microorganismo con metabolismo fermentativo, positivo a pruebas como motilidad, rojo-metilo, degradación de gelatina y tween 80, reducción de nitratos, producción de ácido a partir de maltosa, manitol, trehalosa, glicerol y negativo a citocromo oxidasa, voges-proskauer, desaminación de la fenilalanina, degradación de esculina, gas de glucosa, fluorescencia, producción de indol, producción de hidrogeno sulfurado en TSI, producción de ácido a partir de lactosa, sacarosa, inositol, arabinosa, sorbitol, salicina, rhamnosa y xilosa (Wobeser, 1973; Ewing *et al.*, 1978; O'Leary *et al.*, 1979; Stevenson y Daly, 1982; Austin y Austin, 1999; Davies y Frerichs, 1989; Furones *et al.*, 1993). Sin embargo, se han reportado resultados variables en algunas pruebas como rojo-metilo, voges-proskauer, motilidad a 25°C, liquefacción de la gelatina, fermentación del sorbitol y arabinosa (Stevenson y Daly, 1982).

2.3.4.1 Biotipos.

Recientes aislados muestran que *Yersinia ruckeri* puede ser dividido en grupos clonales basados en Biotipos, serotipos y proteínas de membrana externa de la bacteria, y que dichos grupos clonales podrían estar relacionado a la virulencia del microorganismo. Existen 2 biotipos basados en la hidrólisis del Tween 20, del Tween 80 y de la motilidad. Las cepas caracterizadas como biotipo 2 son no-motiles, y no hidrolizan el Tween 80 (Davies and Frerichs, 1989).

2.3.5 Signos clínicos.

En epizotias agudas tempranas, las afecciones en truchas “arco iris” son letárgia y anorexia y la presencia de hemorragias subcutáneas en y alrededor de la boca, cavidad oral y en la base de las aletas. Pudiendo presentarse a veces también hemorragias en los filamentos de las branquias. Hemorragias petequiales pueden presentarse en la superficie del hígado, páncreas, ciegos pilóricos, vejiga natatoria y en la musculatura lateral. El agrandamiento del bazo, gónadas hemorrágicas y la inflamación del intestino con abundante y espeso liquido amarillento. Otra característica importante también es la exoftalmia que va acompañado de hemorragias alrededor de la cavidad ocular y el iris, llevando generalmente a la ruptura de los ojos. Si el pez sobrevive, estos se oscurecen y buscan refugio alejándose de los otros peces (Busch, 1983).

En infecciones atípicas que a veces puede ocurrir, no necesariamente hay presencia de hemorragias ni en la boca, ni en la cubierta branquial del pez, el pez simplemente se oscurece y nada cerca de la superficie de las pozas de crianza (Frerichs et al, 1985).

2.3.6 Patología.

Las lesiones histopatológicas examinadas de truchas infectadas mostró una aguda bacteremia y una respuesta inflamatoria en casi todos los tejidos. La colonización bacteriana ocurre en las capilares de tejidos bien vascularizados, seguidos luego por la dilatación de pequeños vasos sanguíneos; hemorragias petequiales; abundancia de eritrocitos y edemas en riñón, hígado, corazón y branquias. La necrosis

podría focalizarse en el hígado y en marcadas acumulaciones de células mononucleares en aéreas periportales. Las hemorragias se desarrollan en partes externas del aparato digestivo, convirtiéndose en una mucosa edematosa - necrótica, y a veces con obstrucciones en el lumen (Busch, 1983).

2.3.7 Patogénesis.

El conocimiento sobre la patogénesis de *Yersinia ruckeri* todavía es limitado, es más conocido las patogénesis de otro tipo de bacterias del mismo género, como el de *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia. Enterocolitica*, todos estos causantes enfermedades en los seres humanos. Las enfermedades en humanos causadas por este tipo de yersinias son de diversos tipos así *Y. pestis* es el agente causal de la peste bubónica y neumónica, una enfermedad a menudo mortal transmitida por las pulgas o aerosoles, que infectan a los ganglios linfáticos regionales o los pulmones. *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* son patógenos entéricos, que se transmiten principalmente a través de alimentos o agua contaminados, causando trastornos gastrointestinales (Viboud and Bliska 2005).

En estos últimos años un grupo de investigadores han tratado de revelar los mecanismos patológicos similares entre las yersinias que afectan humanos con las especies de *Yersinia ruckeri* y han investigado la presencia de factores de virulencia comunes. A pesar de que estos agentes causan diferentes signos clínicos y utilizan diferentes modos de transmisión, se han identificado varios factores de virulencia similares (Revell y Miller 2001).

Dos estudios de 1991 analizaron la habilidad de *Yersinia ruckeri* de crecer bajo condiciones limitantes de hierro mostrando que esta bacteria fue capaz de crecer en presencia de un compuesto quelante. Los resultados obtenidos fueron contradictorios y solo uno de ellos mostro la producción de un sistema con alta afinidad por la captación de hierro por este microorganismo (Romalde et al., 1991). Sin embargo ambas investigaciones reportaron la inducción de algunas OMPs in bajas concentraciones de hierro (Davies, 1991; Romalde et al., 1991).

Recientemente Fernandez et al. (2004) encontraron un grupo de genes inducidos en vivo necesarios para la síntesis y utilización de un sideroforo catecholate, denominado ruckerbactin que, muy probablemente, corresponde a la actividad

detectada por Romalde et al. (1991). Algunos de estos genes fueron localizados en la misma región cromosomal constituyendo un cluster de genes teniendo una organización similar a E. coli enterobactin cluster de genes.

Sin embargo, la estructura química del compuesto es probablemente más parecida a la de *Erwinia chrysanthemi*, chrysobactin, que a enterobactin dado que los receptores de la membrana externa accionan con más homología a los receptores chrysobactin. Se demostró que Ruckerbactin está relacionado con la adquisición de hierro en condiciones bajas de hierro in vitro, y durante la infección también. La capacidad de obtención del hierro del medio ambiente es un requisito esencial para el desarrollo del proceso de infección por *Y. ruckeri*. (Fernández et al., 2004)

2.4 Aspecto epidemiológico.

2.4.1 Transmisión.

La infección natural de pez a pez se produce por contacto directo de un pez infectado, la transmisión de la enfermedad se da por la alta cantidad de bacterias que son transmitidas al agua por un pez infectado o portador (Rucker, 1966; Bullock et al, 1976; Bullock and Cipriano, 1990). La transmisión vertical hasta ahora no ha sido demostrada y probablemente no ocurra (Dulin et al., 1976). El estrés en el pez también juega un rol importante en la aparición de brotes la ERM, enfermedad de la “boca roja entérica”. Se observó que peces portadores transmitieron *Y. ruckeri* a peces clínicamente sanos cuando el nivel de temperatura se elevó a 25 ° C, mientras que peces portadores no estresados no manifestaron la enfermedad. El patógeno ha sido aislado de heces de peces portadores dos meses después de un brote de la enfermedad de la “boca roja entérica” (Hunter et al., 1980).

Lingg y Busch (1975) recuperaron la bacteria de diferentes órganos de truchas portadoras asintomáticas, infectados por vía intraperitoneal o inmersión. Ellos demostraron que hasta un 25% de los peces en una población de trucha arco iris podría llevar a *Y. ruckeri* en la parte más baja de los intestinos. La eliminación intestinal del patógeno causó infecciones recurrentes y mortalidad en la población de manera cíclica (Busch and Lingg, 1975).

Al igual que muchas especies de entornos acuático, *Yersinia ruckeri* también es asociado con superficies y sedimentos. Se aislaron cepas de *Yersinia ruckeri* que mostraron la capacidad de formar biopelículas, sobre soportes sólidos, incluyendo muchos de los materiales que comúnmente se utilizan en la cría de peces. El biofilm bacteriano ha demostrado ser muy resistente al ácido oxolínico, antibiótico de uso frecuente en el tratamiento de la ERM (Coquet et al., 2002).

El modo de transmisión de *Y. ruckeri* también se ha relacionado con otros vectores supuestos tales como los invertebrados acuáticos y las aves (Willumsen, 1989).

2.4.2 Rango de hospederos.

Si bien *Yersinia ruckeri* afecta severamente a trucha “arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*), también se han reportado brotes de la enfermedad en poblaciones de trucha común o marrón (*Salmo trutta*), trucha de arroyo, *Salvelinus fontinalis*; King Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*; salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Dulin et al, 1976). Salmón del atlántico, *Salmo salar* y salmón del pacífico (Bullock et al, 1978).

Algunas especies de peces no salmonidos también han sido reportados como portadores del patógeno, estas incluyen al Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* (Danley et al., 1999), emerald dace, *Notropis atherinoides* (Mitchum, 1981); goldfish, *Carassius auratus* (McArdle and Dooley-Martin, 1985); arenque de lago, *Coregonus artedii* (Bullock and Anderson, 1984) y pececillos, *Pimephales promelas* (Michel et al., 1986). Además, la infección de la “boca roja entérica”, también ha ocurrido muchas veces en lagunas especies de peces marinos como, el turbot o rodaballo, *Scophthalmus maximus*, *Dicentrarchus labrax*, *Sparus auratus*, entre otros (Vigneulle, 1990).

2.4.3 Distribución geográfica.

La enfermedad está restringida en su mayoría a salmonidos (Bullock and Snieszko, 1970). Dentro de áreas geográficas de América del norte y de América del sur (Ross et al, 1966; Stevenson and Daly, 1982; Bravo and Kojagura, 2004), Dinamarca (Dalsgaard et al, 1984), Gran Bretaña (Austin, 1982; Roberts, 1983), Francia (Lesel et al, 1983), Alemania (Fuhrmann et al, 1983), Italia (Busch, 1978),

Irlanda (McCormick and McLoughlin, 1993), Noruega (Richards and Roberts, 1978) y Australia (Bullock *et al*, 1978; Llewellyn,1980). Con el reciente aumento en el número de casos de la enfermedad, sobre todo en Europa, al parecer la enfermedad sigue propagándose (Austin y Austin, 2007).

2.5 Diagnóstico.

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad de la “boca roja entérica”, está basado en los signos clínicos del pez enfermo y la inoculación de tejido infectado en el medio diferencial de Shotts and Waltman (1990). La prueba de anticuerpos fluorescentes directa e indirecta, ELISA- monoclonal (Austin et al., 1986), estos son usados para los serotipos I y II; sin embargo como anteriormente se mencionó hay serotipos adicionales teniendo resultados negativo con estos serotipos, pero no se puede descartar que se trate de la ERM. Los antisueros para estos serotipos adicionales generalmente no son muy disponibles. La confirmación del diagnóstico de la enfermedad de la “boca roja entérica”, ERM, requiere aislamiento e identificación del agente casual. La identificación está basada en el aislamiento de una bacteria de forma bacilar, Gram negativa, motil, citocromo oxidasa negativo, produce ácido pero usualmente no produce gas a partir de la glucosa, descarboxila la ornitina y la lisina, Los aislados podrían dar resultados negativos para la esculina y la salicina (Bullock and Cipriano, 1990). Es conocido también la reacción cruzada con antisuero entre *Hafnia alvei* y *Yersinia ruckeri* (Stevenson and Airdrie, 1984). *H. alvei* puede ser diferenciado de *Yersinia ruckeri*, así *H. alvei* es positivo para la fermentación de la xilosa mientras *Y. ruckeri* es negativo (Buller, 2004).

Los resultados entre los test convencionales y el sistema API 20E podría dar resultados variables. Estos incluyen la utilización del citrato, la hidrólisis de la gelatina, Voges Proskauer y el nitrato. El test para nitrato en el sistema API 20E pueden dar resultados poco fiables por ellos se recomienda la metodología convencional con tubos para el test de nitrato. Después de 24 horas de incubación a 25°C, la prueba de citrato y licuefacción de la gelatina podrían dar falsos negativos, se recomienda una incubación hasta las 48h. La motilidad y el citrato dan resultados negativos a una incubación de de 37°C pero positivos a 25°C. El sistema API 20E puede mostrar mas resultados positivos que la prueba convencional con tubos para la prueba Voges Proskauer (Davies and Frerichs, 1989)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio.

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Sección Ictiopatología Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) con sede en Lima.

3.2 Animales y muestras.

El estudio se realizó utilizando muestras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa pre comercial, provenientes del departamento de Junín, una de las regiones con alta producción de truchas; estas muestras recolectadas pertenecieron a la piscigranja: El Edén, ubicada en la provincia Concepción a 3400 m.s.n.m.

Se tomaron mediciones de la temperatura, contenido de oxígeno y pH del agua de las piscigranjas donde se obtuvo la muestra.

Se tomaron muestras de branquias, hígado, bazo, musculo, estómago y riñón, obtenidas mediante necropsia y conservadas en refrigeración en un cooler para luego ser transportadas a la brevedad al laboratorio en Lima.

3.3 Metodología.

3.3.1 Toma de muestras.

Los peces fueron sacrificados mediante corte medular y luego se procedió a la necropsia donde se tomaron muestras de branquias, hígado, bazo, musculo, estómago y riñón, para el análisis histopatológico, que fueron colocadas en formalina tamponada al 10%.

Se tomó muestras de un segmento de riñón (segmento craneal) y bazo para el análisis microbiológico utilizando hisopados y medios de transporte para los cultivos bacteriológicos (medio Stuart).

3.3.2 Procesamiento de muestras.

Los tejidos se procesaron bajo la técnica convencional de coloración para tejidos normales, empleándose la coloración de Hematoxilina-Eosina (H-E). Las alteraciones histopatológicas fueron clasificadas para cada órgano en trastornos inflamatorios, circulatorios, del crecimiento, degenerativos y parasitarios, propuestos por Reimschuessel *et al.* (1992).

Para el análisis microbiológico, a partir del medio de transporte se cultivó las bacterias obtenidas, tras hisopado, en agar TSA (agar tripticasa de soja), incubándose a una temperatura de 22°C por 24 a 48 horas. Se evaluó el crecimiento y características de las colonias, en el examen microscópico se utilizó tinción Gram evaluándose la forma y tipo de las bacterias. Se seleccionó las bacterias compatibles con la morfología de colonias típicas de *Y. ruckeri*, y Gram negativas, luego se colocaron en un cepario para la conservación de la cepa y realizar las pruebas posteriores.

La identificación del agente se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas utilizando un perfil de 20 reacciones para cada bacteria presuntiva aislada. En el perfil bioquímico se evaluó las reacciones de: catalasa, citocromo oxidasa, citrato, motilidad, producción de hidrogeno sulfurado, indol, dextrosa, esculina, manitol, sacarosa, lactosa, urea, gelatina, nitrato, DNAsa, MR-VP, lisina y hemolisis en sangre, se incubó a una temperatura de 22°C por 24 a 48 horas, correspondientes a *Y. ruckeri*, según lo observado en la literatura (Bullock *et al.*, 1978; Austin y Austin, 1999). Todos los medios para las reacciones bioquímicas fueron preparados en el laboratorio. La lectura de los resultados se realizó a las 24 horas en la mayoría de las pruebas y en algunos casos se realizó hasta las 48 horas después de haber sido sembrado dependiendo de cada prueba. Pasado ese tiempo se procedió a la obtención de resultados para su posterior análisis.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de agua.

Se realizó las mediciones de temperatura, contenido de oxígeno y pH, obteniendo los siguientes resultados, la temperatura del agua se midió en 12°C, el contenido de oxígeno disuelto en 8mg/L, pH de 6.8 y moderado grado de turbidez (Cuadro 4).

Cuadro 4: Parámetros de la calidad de agua.

Parámetro	Medición
T°	12 °C
pH	6.8
O° Disuelto	8 mg/L

4.2 Examen de necropsia.

Los animales en estudio, de la piscigranja el “Edén” fueron elegidos por presentar signos de enfermedad tales como nado errático, exoftalmia (Figura 3), úlceras en piel (Figura 4), pigmentación de piel (Figura 5), abdomen abultado, así como aquellos animales con retraso en el crecimiento (Figura 5), hígado pálido (Figura 6), lesión en aletas (Figura 7), Muchos de estos signos clínicos se asemejan a la enfermedad de la “boca roja entérica” producida por *Yersinia ruckeri*.

Durante las necropsias de las Truchas arco iris que manifestaban algún signo de enfermedad, se observaron diversas lesiones: hígado con petequias (Figura 2), ciegos pilóricos, bazo aumentados de tamaño (Figura 2), lesiones tegumentarias (Figura 4), lesiones oculares (exoftalmia) (Figura 3), a su vez se pudo observar que muchos animales presentaron un deficiente desarrollo en lo concerniente a los parámetros de peso y talla, las cuales no correspondían a la edad del ciclo de producción de la granja, también se pudo observar crecimientos irregulares de colas y aletas pectorales, estas presentaban un decrecimiento desproporcional al tamaño del

cuerpo del animal (aletas muy pequeñas en comparación al resto del cuerpo); la frecuencia y porcentaje de las lesiones macroscópicas se detallan en la Cuadro N° 5.

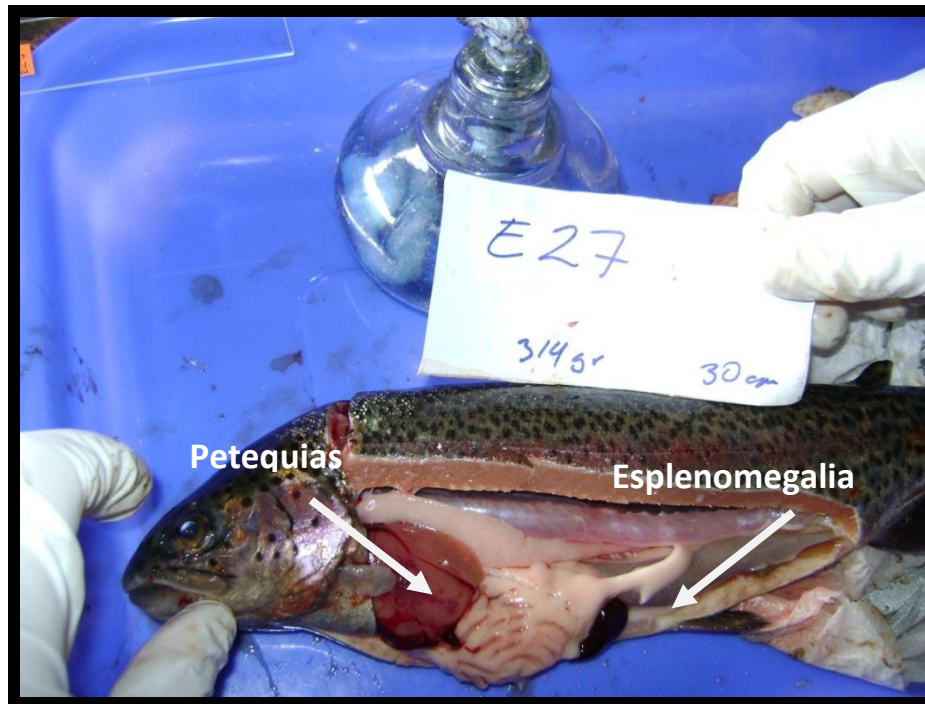


Figura 2. Hígado con petequias y Esplenomegalia.



Figura 3. Exoftalmia.

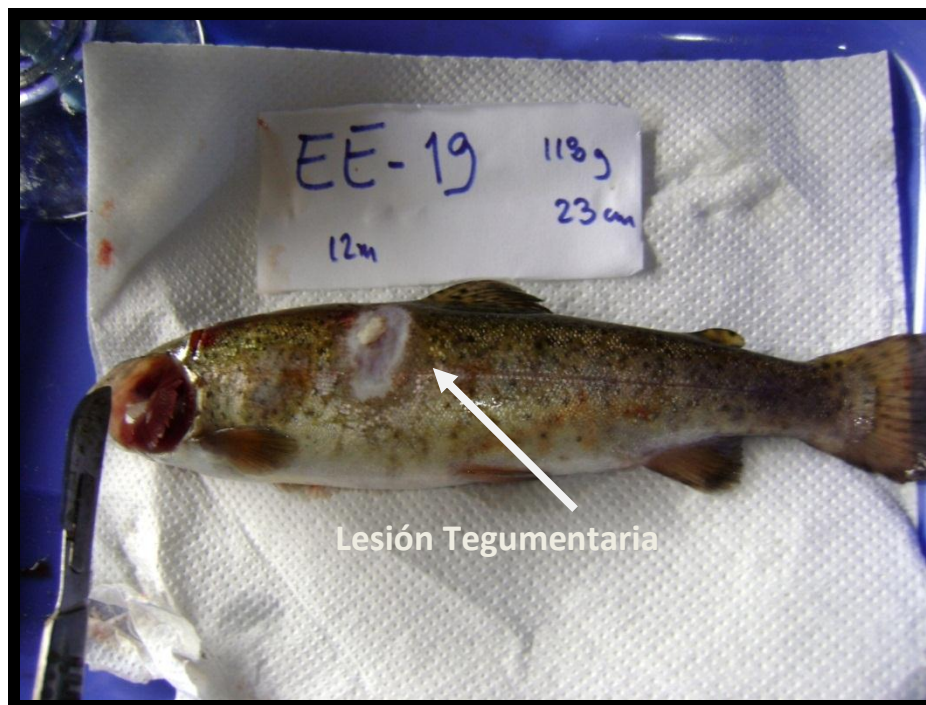


Figura 4. Lesión Tegumentaria.



Figura 5. Melanosis de piel, retraso en el crecimiento.



Figura 6. Hígado Pálido.

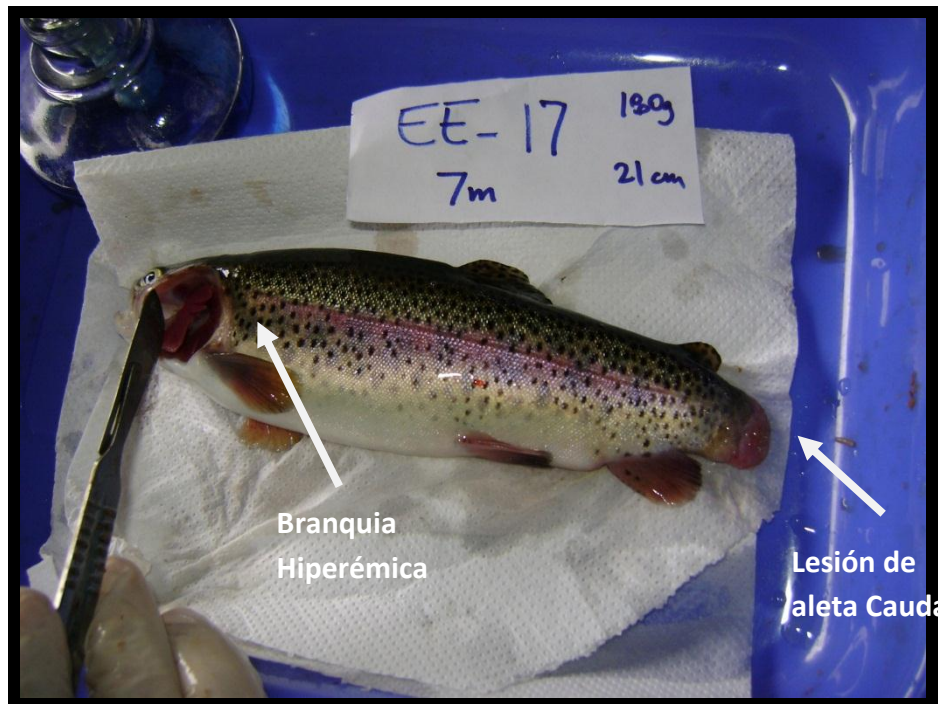


Figura 7. Lesión de aleta Caudal, Branquias Hiperémicas.

Cuadro 5.- Lesiones Macroscópicas de las muestras.

LESIONES MACROSCOPICAS	Frecuencia	%
EXOFTALMIA	8/30	26.66
HIGADO CON PETEQUIAS	15/30	50.00
ESPLENOMEGALIA	24/30	80.00
HIGADO PALIDO	18/30	60.00
HIGADO CONGESTIONADO	3/30	10.00
PETEQUIA EN CIEGO PILORICO	1/30	3.33
BRANQUIAS PALIDAS	4/30	13.33
BRANQUIAS HIPEREMICAS	9/30	30.00
MELANOSIS DE LA PIEL	4/30	13.33
LESION TEGUMENTARIA	5/30	16.67
LESION DE ALETA	8/30	26.66

4.3 Análisis Anatomohistopatológico.

De las 30 muestras tomadas en la Piscigranja “El Eden”, los órganos que se analizaron fueron bazo, branquias, ciegos pilóricos, corazón, estómago, hígado, intestino delgado, piel y riñón (Anexo 2), encontrándose los siguientes resultados.

De las lesiones histopatológicas del bazo se observó como única alteración la congestión 46.66 % (14/30) (Figura 8) (Cuadro 6).

Cuadro 6: Frecuencia de lesiones histopatológicas del Bazo.

	Apariencia Normal	Congestión
Bazo	16	14
Frecuencia	16/30	14/30
%	53.33	46.66

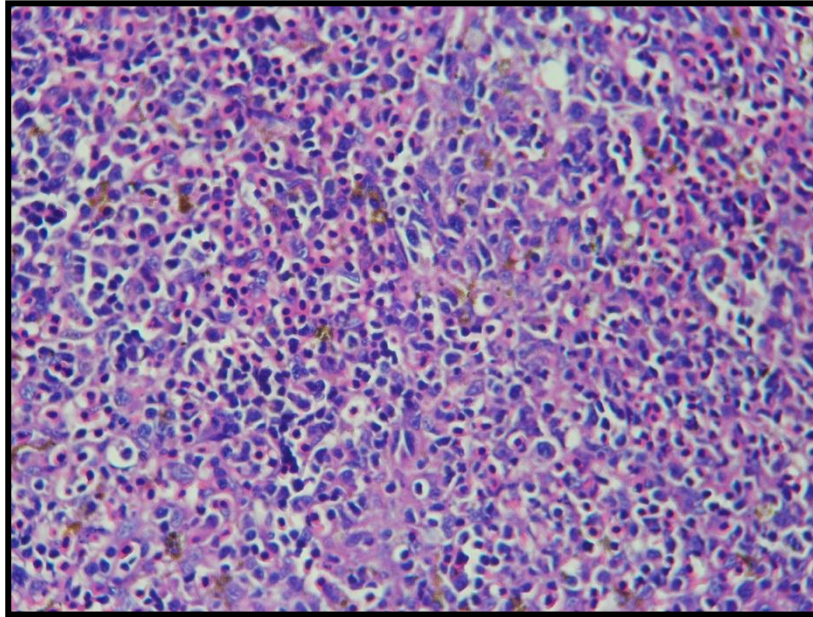


Figura 8. Bazo congestión esplénica.400x.

A nivel de branquias, podemos observar que las lesiones de mayor frecuencia de presentación estaban asociadas a trastornos degenerativos, siendo la fusión de lamelas 56.66% (17/30) la mas frecuente de este grupo y lesiones inflamatorias con evidencia de necrosis 10% (3/30), telangectasia 6.66 % (2/30) y evidencia de bacterias 6.66 % (2/30) se presentaron en menor porcentaje (Cuadro 7). La suma de las lesiones observadas evidencian una branquitis (Figura 9).

Cuadro 7: Frecuencia de lesiones histopatológicas de las Branquias.

	Apariencia Normal	Fusion de Lamelas	Hiperplasia de Filamento	Hiperplasia del Apice	Telangectasia	Necrosis de Lamelas	Presencia de Bacterias
Branquias	4	17	9	12	2	3	2
Frecuencia	4/30	17/30	9/30	12/30	2/30	3/30	2/30
%	13.33	56.66	30.00	40.00	6.66	10.00	6.66

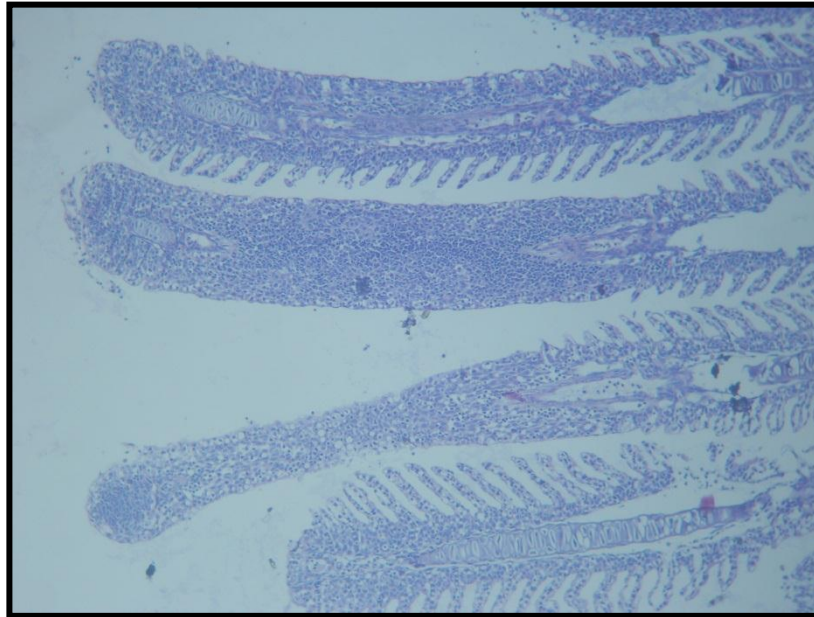


Figura 9. Branquias: Hiperplasia y fusión de lamelas .400x

En los ciegos pilóricos, los trastornos de tipo adaptativo como hiperplasia de enterocitos 33.33 % (10/30) fueron de mayor frecuencia y la presencia de *Microsporidium sp.* 16.66 % (6/30) y CGE 10.00 % (3/30) las de menor frecuencia (Figura 10) (Cuadro 8).

Cuadro 8: Frecuencia de lesiones histopatológicas de los Ciegos Pilóricos.

	Apariencia Normal	Hiperplasia de Vellosidades	Presencia de <i>Microsporidium sp.</i>	Presencia de CGE
Ciegos Pilóricos	15	10	6	3
Frecuencia	15/30	10/30	6/30	3/30
%	50.00	33.33	16.66	10.00



Figura 10. *Microsporidium* sp. en citoplasma del enterocito del ciego pilórico.400x

En el corazón se observaron lesiones inflamatorias como pericarditis en 16.66% (5/30) (Figura 11) y linfocitos en miocardio 10% (3/30). También se determinó al hongo sistémico *Ictiofonus* 20% (6/30) (Figura 12), pero la mayoría se encontraba con apariencia normal 70.00 % (21/30) (Cuadro 9).

Cuadro 9: Frecuencia de lesiones histopatológicas del Corazón.

	Apariencia Normal	Presencia de <i>Ictiofonus</i>	Linfocitos en Miocardio	Pericarditis
Corazón	21	6	3	5
Frecuencia	21/30	6/30	3/30	5/30
%	70.00	20.00	10.00	16.66

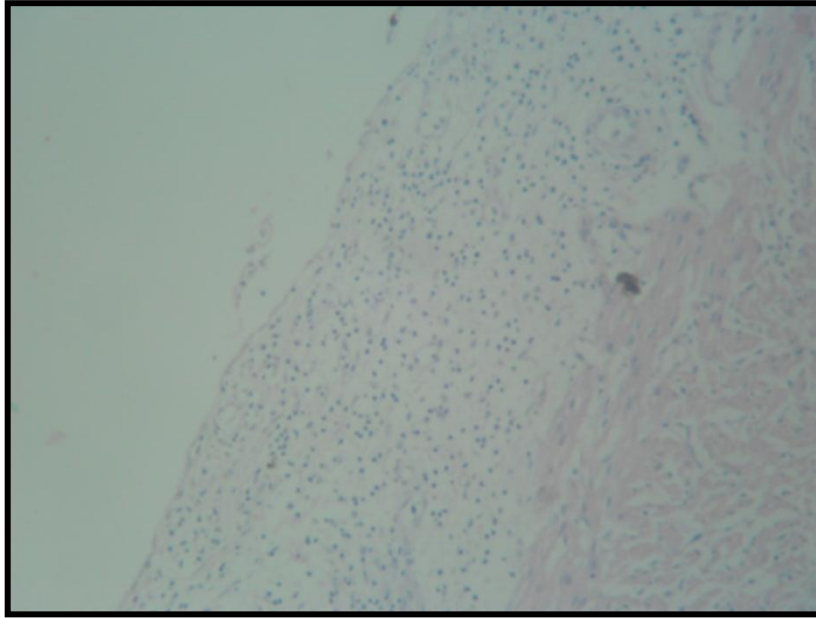


Figura 11. Nótese el incremento del grosor del pericardio con infiltración de células inflamatorias evidenciando pericarditis.400x

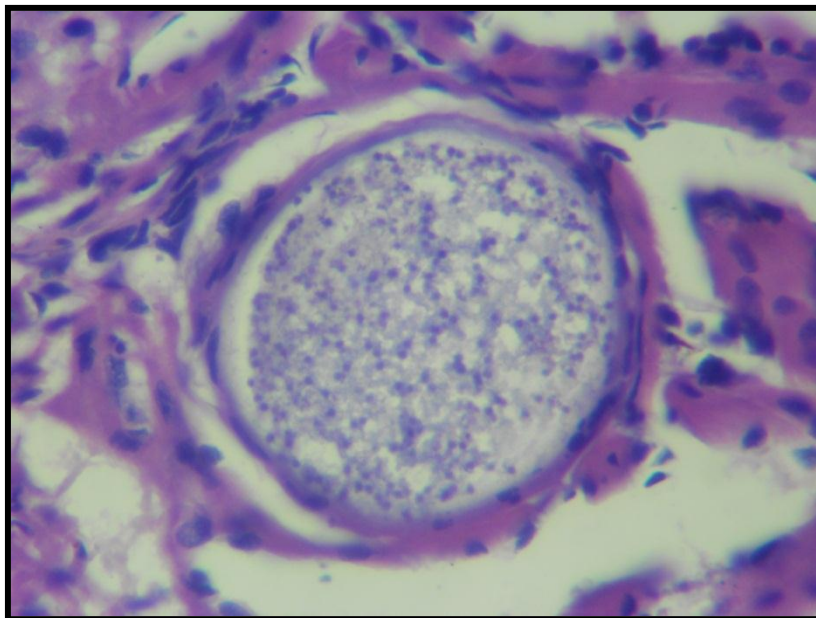


Figura 12. Espora de ictiofonus en miocardio esponjoso del corazón. 400x.

En el estómago se observó que un 16.66 % (5/30) presentaba hiperplasia de la mucosa, también se observó necrosis a nivel muscular 13.33 % (4/30) con presencia hifas (Figura 14), y CGE 6.66 % (2/30) en submucosa en moderada presencia (Figura 13) (Cuadro 10).

Cuadro 10: Frecuencia de lesiones histopatológicas del Estómago.

	Apariencia Normal	Necrosis	Hiperplasia de la Mucosa	Microsporidium sp.	CGE
Estómago	16	4	5	1	2
Frecuencia	16/30	4/30	5/30	1/30	2/30
%	53.33	13.33	16.66	3.33	6.66

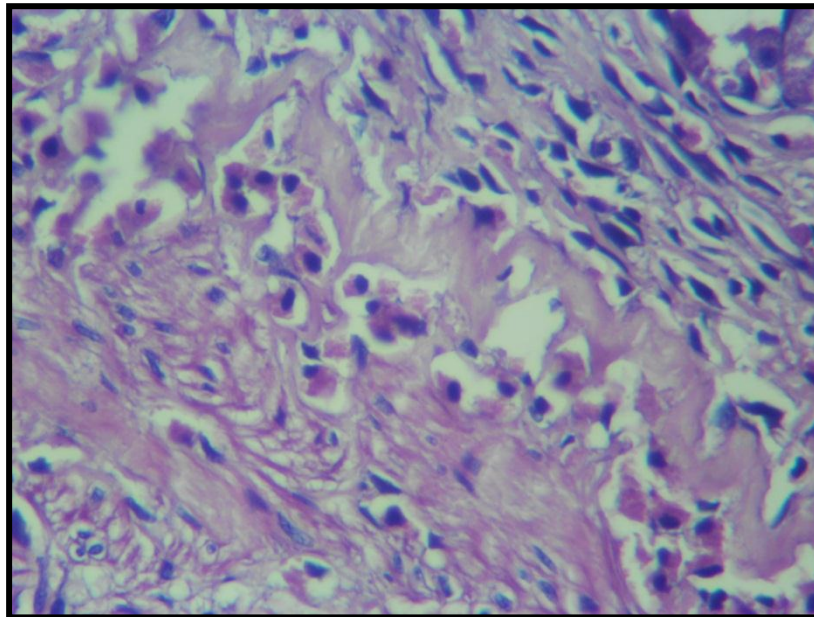


Figura 13. CGE debajo de la submucosa del estómago.400x.

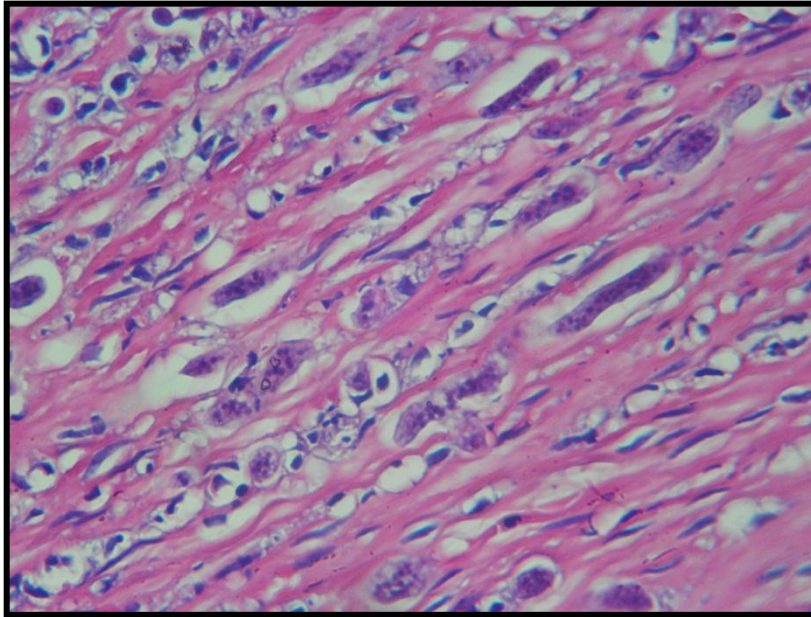


Figura 14. Porción muscular del estómago con severa presencia de hifas de ictiofonus y evidente necrosis muscular.400x.

En el hígado se observó un 56.66 % (17/30) con apariencia normal. La congestión 13.33 % (4/30) con la de degeneración grasa tipo I 13.33 % (4/30) (Figura 15) fueron lo mas frecuente. También se observó el hongo ictiofonus 6.66 % (2/30) en muy baja frecuencia (Cuadro 11) (Figura 16).

Cuadro 11: Frecuencia de lesiones histopatológicas del Hígado.

	Apariencia Normal	Degeneración Grasa				Congestión	Ictiofonus
		I	II	III	IV		
Hígado	17	4	2	1	0		
Frecuencia	17/30	4/30	2/30	1/30	0	4/30	2/30
%	56.66	13.33	6.66	3.33	0	13.33	6.66

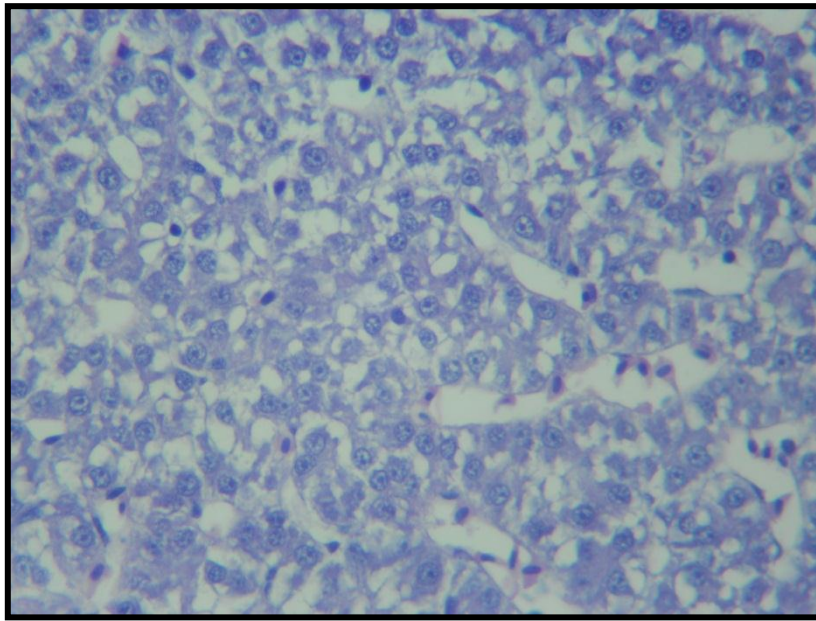


Figura 15. Hígado graso, obsérvese la imagen negativa de la grasa en citoplasma del hepatocito. 400x.

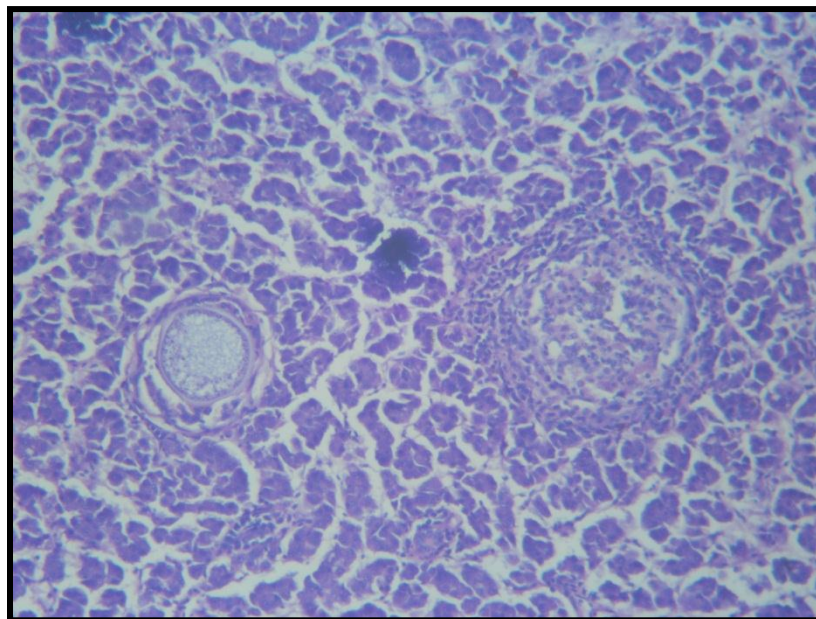


Figura 16. Granulomas en hígado con presencia de esporas de ictiofonus. 400x.

De las lesiones histopatológicas del intestino se observó que las lesiones con más alto porcentaje fueron la hiperplasia en la mucosa con 38.88 % (9/30) atrofia de vellosidades 10.00 % (3/30) (Figura 17), hiperplasia de enterocitos y las de menor frecuencia fueron la necrosis de vellosidades, hiperplasia de caliciformes y CGE con un 6.66 % (2/30) respectivamente (Cuadro 12)

Cuadro 12: Frecuencia de lesiones histopatológicas del Intestino.

	Apariencia Normal	Necrosis de Vellosidades	Hiperplasia de Caliciformes	Hiperplasia de Enterocitos	Hiperplasia de Mucosa	Atrofia de Vellosidades	CGE
Intestino	7	2	2	3	9	3	2
Frecuencia	10/30	2/30	2/30	3/30	9/30	3/30	2/30
%	33.33	6.66	6.66	11.11	38.88	10.00	6.66

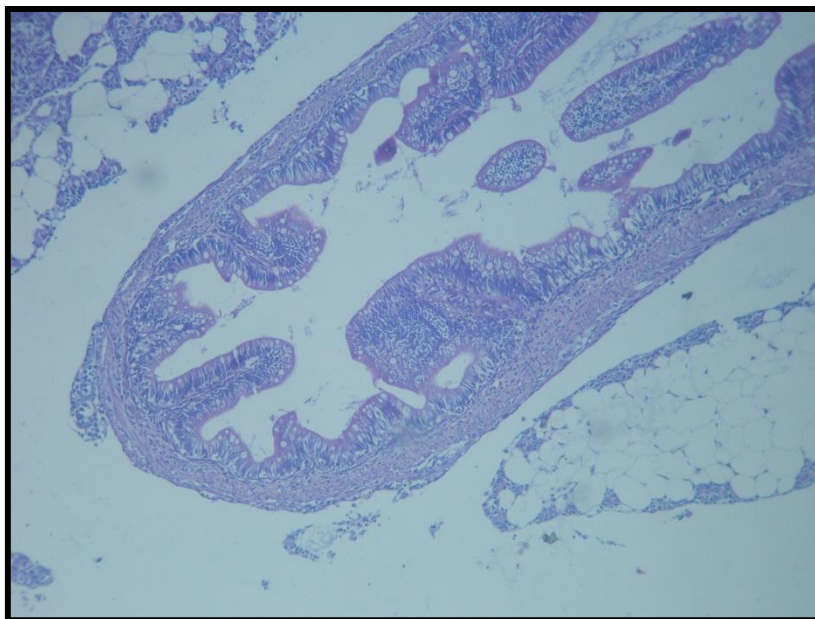


Figura 17. Fusión y atrofia de las vellosidades en intestino.400x

En la piel se observó que el mayor porcentaje de lesiones fueron la atrofia de fibras musculares 33.33 % (10/30) y necrosis muscular 20.00 % (6/30) (Figura 18) y de menor porcentaje fue la degeneración hidrópica muscular 3.33 % (1/30) (Cuadro 13). También se pudo determinar Ictiofonus sp. 6.66 (2/30).

Cuadro 13: Frecuencia de lesiones histopatológicas de la Piel.

	Apariencia Normal	Degeneración hidrópica Muscular	Atrofia de Fibras Musculares	Necrosis Muscular	Presencia de Ictiofonus sp.
Piel	14	1	10	6	2
Frecuencia	14/30	1/30	10/30	6/30	2/30
%	46.66	3.33	33.33	20.00	6.66

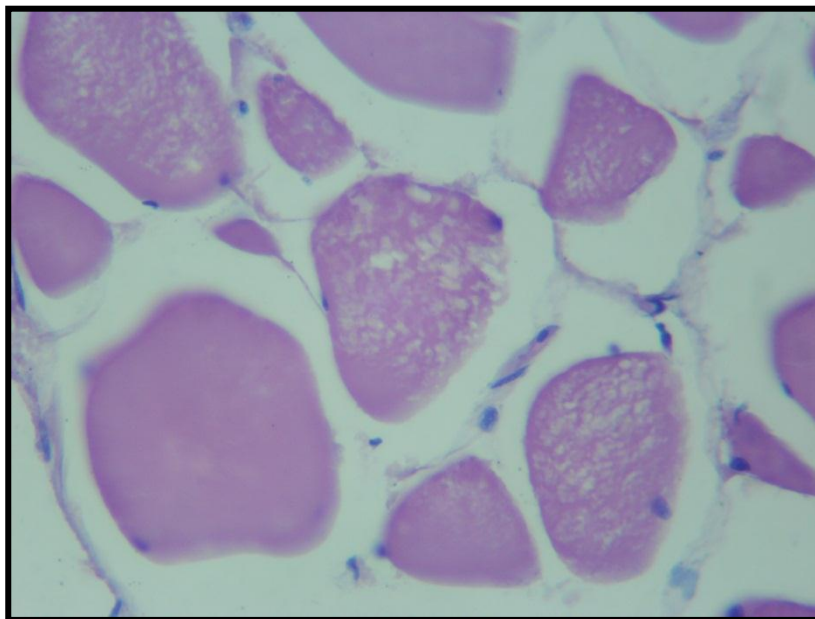


Figura 18. Necrosis de fibras musculares lisas. 400x.

De las lesiones histopatológicas en el riñón se puede observar que las de mayor frecuencia fueron la presencia del hongo ictiofonus con 40.00 % (12/30), gotas hialinas 33.33 % (10/30) (Figura 19) y las de menor porcentaje fueron la presencia de CMM 13.33 % (4/30) y la degeneración tubular 10.00 % (3/30) (Cuadro 14).

Cuadro 14: Frecuencia de lesiones histopatológicas del Riñón.

	Apariencia Normal	Necrosis	Gotas Hialinas	Presencia de CMM	Regeneración Tubular	Degeneración Tubular	Presencia de Ictiofonus
Riñón	8	4	10	4	9	3	12
Frecuencia	8/30	4/30	10/30	4/30	9/30	3/30	12/30
%	26.66	13.33	33.33	13.33	30.00	10.00	40.00

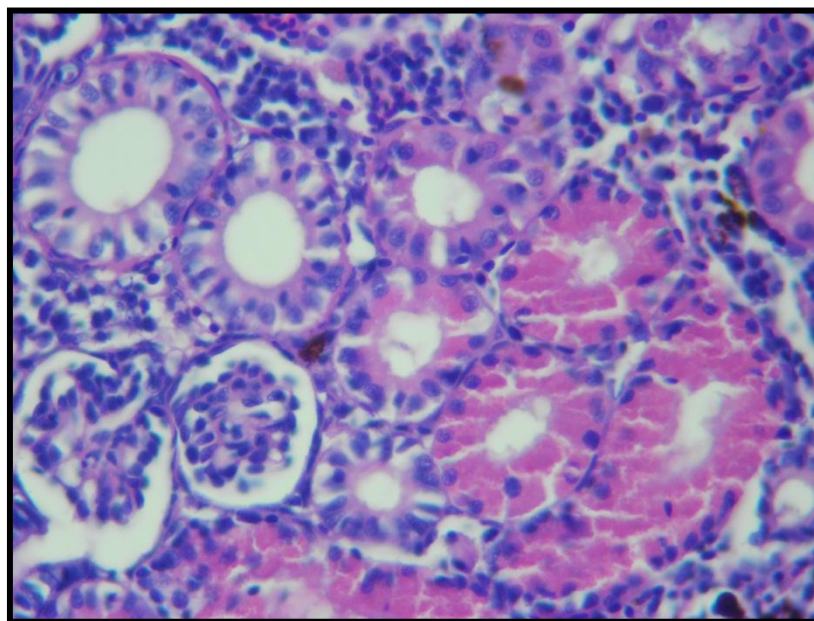


Figura 19. Gotas hialinas y necrosis de epitelio de túbulo renal. 400x.

4.4 Análisis Microbiológico.

A partir de las muestras del bazo y riñón analizados se obtuvieron un total de 21 aislados que crecieron en el agar TSA a una temperatura de 22°C (Cuadro 15), estas presentaron colonias típicas de *Yersinia ruckeri*, translucidas, blanco cremosos, redondas, con diámetros de 1 a 2 mm, lisas, y con bordes completos. A la coloración Gram se observaron bacterias cocobacilares y bacilos cortos, Gram negativos, obteniéndose solo 11 cepas con esas características (Cuadro 16).

Cuadro 15: Aislamiento bacteriano según órgano.

Organo	Gram +	Gram -	Total
Bazo	2	6	8
Riñón	5	8	13
Total	7	14	21

Cuadro 16: Cantidad de bacterias Gram positivas y negativas.

Gram	Diversas Formas	Bacilos Cortos Cocobacilos	Total
Gram +	7	0	7
Gram -	3	11	14
Total	10	11	21

De las 11 cepas Gram negativas y morfológicamente semejantes a *Yersinia ruckeri*, a la prueba de catalasa todas resultaron positivas, sin embargo, a la prueba del citocromo oxidasa, solo 9 de ellas fueron negativas, obteniéndose así 9 cepas típicas de la familia Enterobactereaceae (Cuadro 17).

Cuadro 17: Bacterias pertenecientes a la Familia Enterobactereaceae.

Resultado	Catalasa	Oxidasa
-	0	9
+	11	2
Total	11	11

Mediante pruebas bioquímicas como rojo de metilo, voges-proskauer, descarboxilación de la lisina, citrato, motilidad, licuefacción de la gelatina, reducción de nitrato, producción de hidrogeno sulfurado, producción de indol, dextrosa, esculina, manitol, sacarosa, lactosa, urea, DNAsa y hemolisis en sangre (Anexo 4) se obtuvieron los siguientes resultados; a la prueba de citrato (Cuadro 18), indol y fermentación de lactosa (Cuadro 19), todas resultaron negativas, y a la prueba de hidrólisis de la gelatina todas evidenciaron reacción positiva. (Cuadro 18).

Todas las cepas presentaron motilidad en medio SIM a excepción de la cepa 2 (Cuadro 18). La cepa 9 fue la única que produjo hidrogeno sulfurado, la cepa 1 y 3 degradaron la urea (Cuadro 19) y la cepa 1 fue la única que no redujo el nitrato (Cuadro 18). En cuanto al metabolismo de azúcares, para el caso de la dextrosa las cepas, 1,3 y 6 no lo metabolizaron, solo la cepa 2 metabolizo la sacarosa y el manitol solo fue metabolizado por las cepas 1, 3, 4, 6 y 9 (Cuadro 19). Finalmente solo 3 cepas coincidieron con las características metabólicas, para los diferentes sustratos que se han analizado en el presente estudio y que son típicas de *Yersinia ruckeri* (Anexo 1).

Cuadro 18: Resultados Pruebas Bioquímicas.

	GRAM	CATALASA	OXIDASA	MR	VP	LISINA	CITRATO	MOTILIDAD	GELATINA	NITRATO
1	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG
2	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS
3	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS
4	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS
5	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS
6	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
7	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS
8	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS
9	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS
10	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
11	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS

POS: Positivo NEG: Negativo MR: Rojo de Metilo VP: Voges Proskauer

Cuadro 19: Resultados Pruebas Bioquímicas.

	H2S	INDOL	DEXTROSA	ESCULINA	MANITOL	SACAROSA	LACTOSA	UREA	DNA
1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS
2	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS
3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS
4	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
5	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
7	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
8	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
9	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
10	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
11	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS

POS: Positivo NEG: Negativo H₂S: Producción de hidrogeno sulfurado

5. DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos hubo diferentes reacciones para los diversos tipos de pruebas que se realizó, de todos ellos se obtuvo 3 cepas con reacciones bioquímicas muy semejantes a *Yersinia ruckeri*. Las cepas identificadas como *Yersinia ruckeri* fueron la cepa 5, 7, y 8 (Anexo 3) estas cepas presentaron morfología cocobacilar, coloración Gram negativa, resultaron citocromo oxidasa negativo y catalasa positivo, encontrándose dentro de la familia Enterobacteriaceae (Brenner et al., 2005). Además presentaron reacciones típicas, de *Yersinia ruckeri*, todas estas cepas presentaron motilidad, resultaron negativas a la prueba de citrato, indol, producción de hidrogeno sulfurado, lactosa, esculina, sacarosa, urea, y evidenciaron reacción positiva para la pruebas de rojo de metilo, descarboxilación de lisina, nitrato, licuefacción de la gelatina, dextrosa y manitol como lo describieron Ewing *et al.s* (1978) y Austin and Austin (2007) en aislados de truchas “arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*) de la zona de Idaho, Washington, Alaska, Tennessee, Ohio.

Las otras cepas que no fueron determinados como *Yersinia ruckeri* tuvieron características muy variadas, así la cepa 1 y 3 fueron descartadas inicialmente de estar incluidos en la familia Enterobacteriaceae, por presentar reacción citocromo oxidasa positiva, la cual los descarta de pertenecer a las enterobacterias pero podrían tratarse de otras bacterias Gram negativas tal y como fue reportado en el primer aislamiento de *Yersinia ruckeri* en el Perú (Brenner et al., 2005; Bravo and Kojagura, 2004).

De los resultados obtenidos se puede observar que la mayoría de las cepas aisladas provienen de riñón, y que las 3 cepas identificadas como *Yersinia ruckeri*, también fueron aisladas a partir de dicho órgano en las truchas. La presencia de aislados Gram positivos evidencia que existen otras bacterias que podrían estar implicadas en la alteración de la salud de los peces. Sin embargo es necesario determinar si actúan solas o en sinergismo con *Y. ruckeri* para producir enfermedad en los peces, a que familia, género y especie pertenecen y cuál es el rol que cumplen dentro de la producción de enfermedades en los peces.

Por los resultados obtenidos las cepas de *Y. ruckeri* aisladas del presente estudio tienen características bioquímicas semejantes a las descritas a las cepas americanas y europeas incluyendo la motilidad, lo cual indicaría además que no se

han encontrado cepas de *Y. ruckeri* no motiles, que son características de las cepas de *Y. ruckeri* provenientes de Australia como lo reportaron Bravo and Kojagura (2004) en piscigranjas del Departamento de Junín.

Las lesiones observadas a la necropsia externamente tales como exoftalmia 8/30 (26.66 %), melanosis 4/30 (13.33 %), lesión de aletas 8/30 (26.66 %), branquias congestionadas 9/30 (30.0 %), solución de continuidad en el tegumento 5/30 (16.66 %), a la apertura se observó esplenomegalia 22/30 (80.0 %), hemorragias de tipo petequiral hepáticas 15/30 (50.0 %), hígado congestionado 3/30 (10.0 %), evidencian una condición alterada de la salud del pez de posible origen infeccioso, lo cual fue corroborado mediante el estudio microscópico al observarse lesiones y células inflamatorias como alteraciones vasculares asociadas a congestión 4/30 (13.33 %), presencia de bacterias, presencia incrementada de CGE (Complejo Granuloma Eosinofílico) como otras células inflamatorias, necrosis en diversos órganos, esto nos confirma que los individuos muestreados se encontraban expuestos a un agente infeccioso activando el sistema inflamatorio en respuesta al daño ocasionado (Ferguson, 2006). Así mismo las lesiones observadas a nivel de las branquias como fusión de lamelas (17/30) 56.66 %, hiperplasia (12/30) 40.00 % de los ápices branquiales sugieren como causa para este proceso patológico pobre calidad del agua (Ramírez, 2009), sin embargo la evidencia de necrosis y la severidad de la presentación de las lesiones, con reacción inflamatoria e incremento de CGE, observación de bacterias bacilares entre las lamelas y adheridas en la superficie confirman que la causa de las lesiones es de origen infeccioso. Dentro de los agentes bacterianos con morfología bacilar se encuentran las *Aeromonas* sp, podría tratarse de este agente ya que es un residente normal del agua pero las lesiones a nivel de piel como soluciones de continuidad y reacción inflamatoria a nivel de musculo observadas en algunos peces, confirman que es una consecuencia de una infección. Estos agentes se vuelven patógenos cuando sobrepasan el equilibrio agente, huésped, ambiente así mismo si los peces se encuentran inmunosuprimidos lo que facilita el ingreso de esta bacteria en los individuos susceptibles.

La histopatología de los ciegos pilóricos evidencio hiperplasia de enterocitos (5/30) 16.66 % e hiperplasia de las vellosidades (5/30) 16.66 % esto podría darse por problemas adaptativos como ayuno prolongado, sin embargo también la presencia de parásitos podrían producir lesiones similares, como fue el caso de algunos peces de

este estudio donde se encontraron microsporidium sp. integros como lisados en el citoplasma de los enterocitos.

En el corazón encontramos 6/30 (20.0 %) de muestras con esporas de ictiofonus, con linfocitos en el miocardio 3/30 (10.00 %) y el 5/30 (16.66 %) presentaron Pericarditis, es sabido que existen otros agentes infecciosos diferentes a *Y. ruckeri* como el hongo sistémico ictiofonus sp. que están alterando la salud de las truchas arco iris tal como fue reportado en el Perú (Mateo, 1996; Bravo and Kojagura, 2004) que se presentan de manera crónica, además pueden existir otros agentes bacterianos que inducen pericarditis como la bacteria *Streptococcus iniae* (Eldar and Ghittino, 1999; Romano and Mejia, 2003), lo cual no podemos descartar ya que al inicio del estudio para el aislamiento de los grupos bacterianos se realizó inicialmente el Gram y se obtuvieron aislados Gram positivos (7/21). En el estómago encontramos necrosis 4/30 (13.33 %) y 5/30 (16.66 %) de hiperplasia de la mucosa ambas lesiones pueden provocar una digestión inadecuada. A nivel del intestino encontramos, 2/30 (6.66 %) de hiperplasia de células caliciformes, 3/30 (11.11 %) de hiperplasia de los enterocitos, 9/30 (38.88 %) de hiperplasia de la mucosa y 2/30 (6.66 %) de necrosis en las vellosidades indicando una enteritis catarral y necrótica lo cual nos indicaría una posible infección con *Y. ruckeri* (Furones, 1993). La histopatología de Piel nos muestra degeneración hidrópica muscular 1/30 (3.33 %), atrofia de fibras musculares 10/30 (33.33 %), sugieren problemas asociados a la nutrición que pueden estar ligados a deficiencia de proteínas o inadecuada calidad de las mismas, sin embargo existen otras lesiones que acompañan a estas causas que deben ser observadas a parte de las mencionadas. La necrosis muscular 6/30 (20.00 %) se asocia a múltiples causas, dentro de ellas las nutricionales como por deficiencia de vit E y selenio para evitar la necrosis por peroxidación de ácidos grasos de las membranas celulares (Ferguson, 2006). Por otro lado, la necrosis muscular es causada por causas infecciosas asociadas a bacterias, en nuestro caso se observaron bacterias de morfología bacilar y evidencia de reacción inflamatoria lo que permite asociar el daño con la causa del problema. Dentro de las bacterias que producen ese tipo de lesión están las *Aeromonas* sp que son residentes normales del agua pero pueden hacerse patógenas cuando los peces están inmunosuprimidos (Vera, 2005). Así mismo no es una lesión característica de *Y. ruckeri* además que su característica morfológica no coincidía con la mencionada por lo que descartamos la posibilidad que fuera *Y. ruckeri*. Lamentablemente no se hizo la determinación bioquímica de esos aislados ya que el estudio solo contempló la caracterización de *Y. ruckeri*.

La presencia de lesiones en el riñón melanomacrofagos 4/30 (13.33 %), degeneración tubular 3/30 (10.00 %) y necrosis 4/30 (13.33 %), evidencian que hay un problema de posible origen infeccioso como lo indica Ferguson (2006) relacionado a agentes bacterianos, en nuestro caso observamos ictiofonus 12/30 (40.00 %), hongo sistémico que fue evidenciado en diferentes órganos además de presentarse como esporas y conformando lesiones crónicas como granulomas. Sin embargo en ese caso esas lesiones también pueden estar asociadas a la nutrición en relación a la proteína, debido a que se encontró 10/30 (33.33 %) de presencia de gotas hialinas, de manera similar a lo descrito por Iregui (2004) en cachamas cultivadas en Colombia. Esto sumado a las lesiones de musculo mencionadas anteriormente así como las del hígado degeneración grasa en los siguientes porcentajes tipo I 4/30 (13.33 %), tipo II 2/30 (6.66 %), tipo III 1/30 (3.33 %) y tipo IV cero, podrían sugerir inicios de problemas asociados al alimento.

En resumen, el análisis general de los aislados y las lesiones observadas indican que existe *Y. ruckeri* en el centro de producción piscícola con características bioquímicas a las descritas para las cepas americanas y europeas pero que están en una baja frecuencia de presentación en el centro estudiado. Esta bacteria no está sola produciendo la infección y los signos clínicos y lesiones en los peces afectados. Existen otras bacterias no entéricas que también están afectando a las truchas de cultivo del centro piscícola en estudio pero que no sabemos aún a que familia pertenecen pero son sugerentes de ser del genero aeromonas por la morfología y el tipo de lesión observadas. Se ha logrado determinar en los peces estudiados otros agentes infecciosos como el hongo sistémico Ictiofonus.

6. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de *Y. ruckeri* en la piscigranja de estudio de la provincia de Concepción de la Región Junín.
- Las cepas de *Y. ruckeri* aisladas de la piscigranja en estudio tiene características bioquímicas semejantes a los aislados reportados por primera vez en Idaho.
- Existen bacterias Gram positivas así como el hongo sistémico *Ictiofonus* sp. asociados a las lesiones en las truchas arcoíris juveniles enfermas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Akhlaghi M, Sharifi YH. 2008.** Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* 4: 347-352.
2. **Amend DF, Johnson KA, Croy TR, McCarthy DH. 1983.** Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins. *Journal of Fish Diseases*, 4: 337-344.
3. **Austin B, Green M, Rodgers, CJ. 1982.** Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture* 1: 73-78.
4. **Austin B, Bishop I, Gray C, Watt B, Dawes J. 1986.** Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms. *Journal of Fish Diseases*. 9. 5: 469-474.
5. **Austin B, Austin D. 1999.** Bacterial fish pathogens-diseases of farmed and wild fish. *Springer-Verlag*, 2nd Edn 188-226.
6. **Austin B, Austin D. 2007.** Bacterial fish pathogens-diseases of farmed and wild fish. *Springer-Verlag, 2nd Edn.*, 188-226.
7. **Bravo S, Kojagura V. 2004.** First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* 2: 104.
8. **Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. 2005.** Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer., two (The Proteobacteria), Part B.
9. **Buller NB. 2004.** Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals A Practical Identification Manual. *Department of Agriculture South Perth Western Australia*.

10. **Bullock GL, Cipriano RC. 1990.** Enteric Redmouth Disease of Salmonids. .
Fish Disease Leaflet 82.
11. **Bullock GL, Anderson DB. 1984.** Immunization against *Yersinia ruckeri*, cause of enteric redmouth disease. *P. de Kinkelin, ed. Symposium on fish vaccination Office International des Epizooties*, 151- 166.
12. **Bullock GL, Stuckey HM, Herman RL, Smith CE. 1976.** Comparative susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the enteric redmouth bacterium and *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Wildlife Diseases*, 3:376-379.
13. **Bullock GL, Stuckey HM, Shotts EB. 1978.** Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. *Journal of Fish Diseases* 4:351-356.
14. **Bullock GL, Snieszko SF. 1970.** Fin rot, coldwater disease, and peduncle disease of salmonid fish. *United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Fish Disease Leaflet*, 25:1-3.
15. **BUSCH RA. 1978.** Enteric redmouth disease (Hagerman strain). *Mar. Fish. Rev.*, vol. 40, p. 42-51.
16. **Busch RA. 1982.** Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In *Antigens of Fish Pathogens. Symposium Internacional de Talloires.*, 201 - 223.
17. **Busch RA. 1983.** Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). *Antigens of fish pathogens. Collection Fondation Marcel Merieux, Lyon, France*, 201-222
18. **Busch RA, Lingg AJ. 1975.** Establishment of an Asymptomatic Carrier State Infection of Enteric Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 12: 2429-2432.

19. **Cipriano R, Schill W, Pyle S, Horner R. 1986.** An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitol-positive serovar 2 strain of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Wildlife Diseases*, 4: 488-492.
20. **Coquet L, Cosette P, Quillet L, Petit F, Junter GA, Jouenne T. 2002.** Occurrence and Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. *Applied and Environmental Microbiology* 2:470-475.
21. **Dalsgaard I, From J, Horlyck V. 1984.** First observation of *Yersinia ruckeri* in Denmark. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 4: 10.
22. **Danley ML, Goodwin AE, Killian HS. 1999.** Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 6: 451-456.
23. **Davies RL. 1991.** Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology* 1-2: 125-140.
24. **Davies RL, Frerichs GN. 1989.** Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases* 4:357-365.
25. **Dill WC. 1997.** History and status of introduced fishes in California, 1871-1996. *California Department of Fish and Game Fish Bulletin* 178: 414.
26. **Dulin MP, Huddleston RE, Larson GW, Klontz. 1976.** Enteric redmouth disease. *Univ. Idaho, Moscow, For. Wildl. Range Exp. Stn., Contrib.* 16: 15.
27. **Eldar A, Ghittino C. 1999.** *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Diseases of aquatic organisms* 3: 227-231.

28. **Evenhuis JP, LaPatra SE, Verner-Jeffreys DW, Dalsgaard I, Welch TJ. 2009.** Identification of Flagellar Motility Genes in *Yersinia ruckeri* by Transposon Mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 20: 6630-6633.
29. **Ewing WH, Ross AJ, Brenner DJ, Fanning GR. 1978.** *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1: 37-44.
30. **FAO. 2010.** Estadísticas de pesca y acuicultura 2008. Roma, 72.
31. **Ferguson HW. 2006.** Systemic Pathology of Fish. A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and Their Responses in Disease. 2nd Edn., Escotian Press.
32. **Fernández L, Márquez I, Guijarro JA. 2004.** Identification of Specific In Vivo-Induced (ivi) Genes in *Yersinia ruckeri* and Analysis of Ruckerbactin, a Catecholate Siderophore Iron Acquisition System. *Applied and Environmental Microbiology* 9: 5199-5207.
33. **Frerichs GN, Stewart JA, Collins RO. 1985.** Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 4: 383-387.
34. **Fuhrmann H, BÖhm KH, Schlotfeldt HJ. 1983.** An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *Journal of Fish Diseases* 3: 309-311.
35. **Furones MD, Rodgers CJ, Munn CB. 1993.** *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 105-125.
36. **Godoy M. 2002.** Truchicultura. 2° Edición. Perú: Editorial Perú, 247
37. **Hamdi S, AVCI SB. 2005.** Pathological Findings in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Experimentally Infected with *Yersinia ruckeri*. *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 1321-1328.

38. **Hunter VA, Knittel MD, Fryer JL. 1980.** Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 6: 467-472.
39. **Iregui CH, Jimenez A, Pulido A, Rey A, Comas J, Peña L, Rodriguez M. 2004.** Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia. *Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Grupo de Fisiopatología Veterinaria. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*(70p).
40. **Lesel R, Lesel M, Gavini F, Vuillaume A. 1983.** Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in France. *Journal of Fish Diseases* 4: 385-387.
41. **Romano L, Mejia J. 2003.** Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente y que afecta a peces de cultivo y a humanos. *Revista AquaTIC* 18.
42. **Llewellyn LC. 1980.** A bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia. *Journal of Fish Diseases* 1: 29-39.
43. **Mateo E. 1996.** La ictiofonosis y su prevalencia en las principales piscigranjas del valle del Mantaro. *Univ. Nacional Federico Villarreal. Perú*, 145.
44. **McArdle JF, Dooley-Martyn C. 1985.** Isolation of *Yersinia ruckeri* type I (Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus*. *Bull. Eur. Assoc, Fish Pathol* 5:10-11.
45. **McCarthy DH., Johnson KA. 1982.** A serotypic survey and cross-protection test of North American field isolates of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 4: 323-328.

46. **McCormick JI, McLoughlin F. 1993.** The characterisation and pathogenicity of the first isolate of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Northern Ireland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 13: 138-140.
47. **Michel C, Faivre B, Kinkein P. 1986.** A clinical case of enteric redmouth in minnows (*Pimephales promelas*) imported in Europe as bait-fish. *Bull.Eur.Assoc. Fish Pathol* 6: 97-99.
48. **Mitchum DL. 1981.** Concurrent infections: ERM and furunculosis found in emerald shiners. *Fish Health Section/American Fisheries Society Newsletter* 4: 2.
49. **O'Leary PJ, Rohovec JS, Fryer JL. 1979.** A further characterization of *Yersinia ruckeri* (enteric redmouth bacterium). *Fish Pathology* 2: 71-78.
50. **PRODUCE. 2008.** Anuario Estadístico 2008.
51. **Pyle SW, Schill WB. 1985.** Rapid serological analysis of bacterial lipopolysaccharides by electrotransfer to nitrocellulose. *Journal of Immunological Methods* 2: 371-382.
52. **Ramírez W, Rondón I, Vidal H, Eslava P. 2009.** Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida roundup® más surfactante cosmoflux® 411f. Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura. Villavicencio, Meta, Colombia.
53. **Reimschuessel R, Bennett RO, Lipsky MM. 1992.** Communications: A Classification System for Histological Lesions. *Journal of Aquatic Animal Health* 2: 135-143.
54. **Revell PA, Miller VL. 2001.** *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 2: 159-164.

55. **Richards RH, Roberts J. 1978.** Bacteriology of teleosts. In: Roberts R.J. (ed.). London, Bailliere Tindall, *Fish Pathology* 183-204.
56. **Roberts MS. 1983.** A report of an epizootic in hatchery rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 6: 551-552.
57. **Romalde JL, Conchas RF, Toranzo AE. 1991.** Evidence that *Yersinia ruckeri* possesses a high affinity iron uptake system. *FEMS Microbiology Letters* 2-3: 121-125.
58. **Ross AJ, Rucker RR, Ewing WH. 1966.** Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology* 4: 763-770.
59. **Rucker R. 1966.** Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin de L' Office International des Epizooties* 65: 825-830.
60. **Secades P, Guijarro JA. 1999.** Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. *Applied and Environmental Microbiology* 9: 3969-3975.
61. **Shotts E, Waltman WD. 1990.** A medium for the selective isolation of *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Wildlife Diseases* 2: 214-218.
62. **Smith GR, Stearley RF. 1989.** The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trouts. *Fisheries* 1: 4-10.
63. **Stevenson RM, Airdrie DW. 1984.** Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *Journal of Fish Diseases* 4: 247-254.
64. **Stevenson RM, Daly JG. 1982.** Biochemical and Serological Characteristics of Ontario Isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 6: 870-876.

65. **Tobback E. 2009.** Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Faculty of Veterinary Medicine Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases.*
66. **Troncoso HM, Maria S, Portell V, Pilar, Figueroa G, Guillermo. 1994.** Aislamiento de *Yersinia ruckeri* en salmónidos de cultivo. *Avances en Medicina Veterinaria* 2: 122-127.
67. **Vera MR. 2005.** Caracterización Patológica (macroscópica, microscópica y clínica) de las vibriosis por vibrio ordalli en salmon del atlántico (*Salmo salar*) en el sur de Chile. Universidad Católica de Temuco Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias.
68. **Viboud GI, Bliska JB. 2005.** Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* 1: 69-89.
69. **Vigneulle M. 1990.** Yersinose des salmonides: étude comparée de différents modes de vaccination. *Ichthyophysiological Acta* 13: 43-58.
70. **Willumsen B. 1989.** Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 3: 275-277.
71. **Wobeser G. 1973.** An Outbreak of Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 4: 571-575.
72. **Woo PT, Bruno DW. 1999.** Fish Diseases and Disorders. Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. *CAB International, Wallingford, UK., 3.*

8. ANEXO

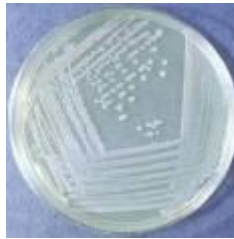
- Anexo 1

Flujograma del Aislamiento de *Yersinia ruckeri*



Muestra de Bazo y Riñón de trucha Arco iris

Sembrar en Agar TSA por estriado



Incubar a 22°C por 24 a 48 horas

Realizar coloración Gram, pruebas de catalasa y oxidasa

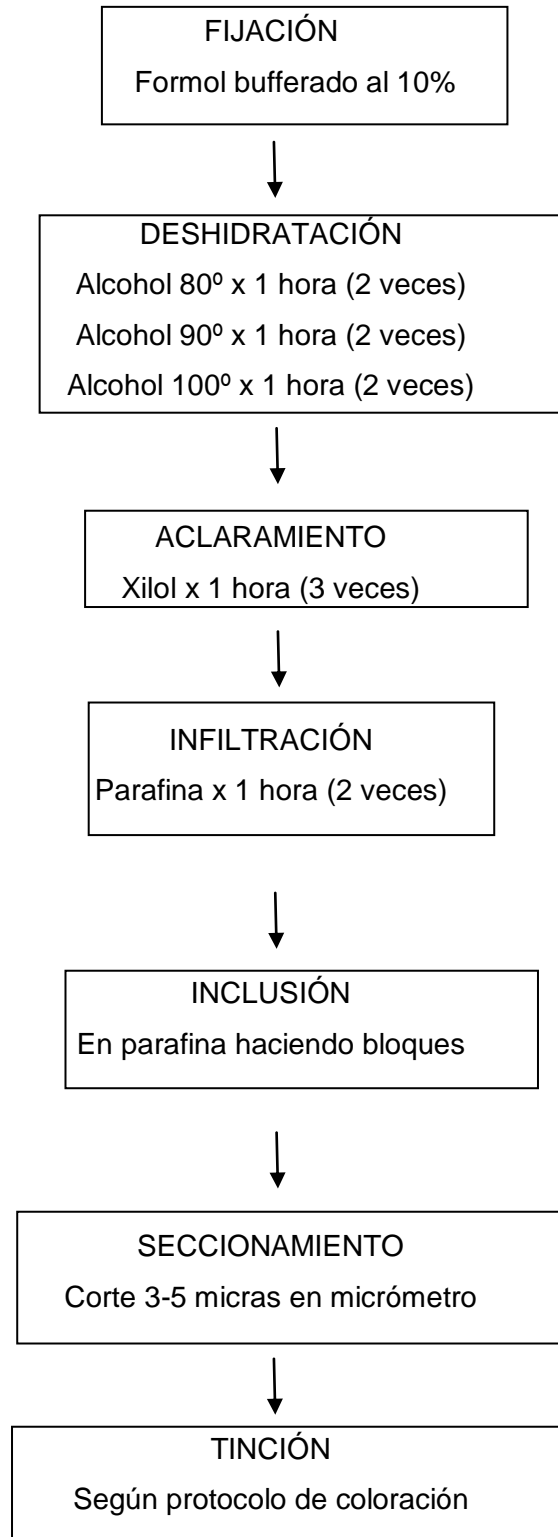
Pruebas Bioquímicas
para identificación de
especie

Colocar en
Cepario



- Anexo 2

Protocolo para el procesamiento de muestra para histopatología



- **Anexo 3**

Pruebas Bioquímicas

A. PRESENCIA DE OXIDASA

La prueba se basa en comprobar la existencia de proteínas citocromo c que forman parte de algunas cadenas transportadoras de electrones propias del metabolismo respirador. La presencia de citocromo c se manifiesta por la capacidad del colorante tetrametil-pfenilendiamina de oxidarse al ceder electrones al citocromo c, apareciendo una coloración azul (forma oxidada).

B. PRUEBA DE LA CATALASA

En los ambientes acuosos, que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células, aparecen formas tóxicas derivadas del oxígeno. Las bacterias que viven en ambientes aerobios necesitan un equipo enzimático capaz de neutralizar estas formas tóxicas. Entre estas enzimas se encuentra la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

C. PRUEBA DEL INDOL

Esta prueba se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias. Esta enzima degrada el aminoácido triptófano a indol, compuesto que se determina en el ensayo. Para realizar esta prueba, la bacteria se cultiva en un caldo de triptona con NaCl al 0,5 % (medio especialmente rico en triptófano). Si la bacteria tiene la enzima triptofanasa, al añadir al medio el reactivo de Kovacks, este formará un complejo con el indol y se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva.

D. PRUEBAS DEL ROJO DE METILO (RM) Y VOGES-PROSKAUER (VP)

Las bacterias que en anaerobiosis fermentan los azúcares pueden realizar esto por distintas rutas. Las enterobacterias son anaerobios facultativos que utilizarán la glucosa en dos fases: primero la metabolizarán aerobiamente, consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, para, en segundo lugar, continuar metabolizándola por vía anaerobia (fermentación). Esta fermentación puede ser de dos tipos:

a. Fermentación ácido-mixta. Los productos finales son ácidos orgánicos (fórmico, acético, láctico y succínico) y etanol. Fermentación característica de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia*.

b. Fermentación butilén-glicólica. Los productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoína como intermediario. Fermentación característica de los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y la mayoría de especies *Erwinia*. La liberación de ácidos orgánicos en el primer tipo de fermentación (ácido-mixta) generará un acusado descenso del pH que podrá ser detectado añadiendo al medio un indicador de pH como el rojo de metilo (rojo a pH de alrededor 4,0). Si la fermentación que se ha llevado a cabo es del tipo butilén glicólica, la producción de acetoína puede ser detectada añadiendo al medio KOH y alfa-naftol (prueba Voges-Proskauer) que reaccionará con este compuesto produciendo un color rojo característico.

E. AGAR CITRATO DE SIMMONS

Este medio indica la capacidad de las bacterias de metabolizar el citrato. Contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno y azul de bromotimol como indicador de pH. Únicamente las bacterias capaces de metabolizar el citrato (indica presencia de la enzima citrato permeasa) podrán multiplicarse en este medio y, al hacerlo, utilizarán los fosfatos presentes liberando iones amonio. Estos iones amonio que evolucionan a amoníaco, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que se manifestará por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul.

F. AGAR SIM

En AGAR SIM se determina la capacidad de un microorganismo de moverse (Presencia de flagelos), de producir INDOL y H₂S. El INDOL es uno de los productos del metabolismo del aminoácido TRIPTOFANO. Las bacterias que poseen la enzima TRIPTOFANASA son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol se puede detectar en un medio adecuado observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Erlich o de Kovacs indicando una prueba POSITIVA, debido a que el indol reacciona con el grupo aldehído del p- dimetilaminobenzaldehído. Si el color es amarillo indica una prueba NEGATIVA. EL SIM es un medio semisólido sin hidratos de carbono que inhiban la producción de H₂S y tiene TIOSULFATO DE SODIO fuente de azufre y HIERRO PEPTONADO como indicador de H₂S, lo que lo hace más sensible en la detección de H₂S por producción de un precipitado negro de sulfuro ferroso. La MOVILIDAD BACTERIANA es otra característica importante en la identificación final de especie, se

realiza en medios semisólidos como el SIM, debiéndose leer antes que la prueba de indol porque al agregar el reactivo de Erlich ésta se puede enmascarar. La prueba de motilidad se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación.

G. GLUCOSA, LACTOSA, SACAROSA y MANITOL.

Determinar si una bacteria FERMENTA o no éstos hidratos de carbono. Con o sin producción de gas. Algunas bacterias pueden metabolizar (fermentar) diversos hidratos de carbono con producción de ácido, anaeróticamente. El indicador de pH es el ROJO DE FENOL que en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color rojo.

H. AGAR UREA

En el agar UREA se determina la capacidad de un microorganismo de producir UREASA y desdoblar la urea, formando 2 moléculas de amoníaco. El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, denominada carbamida. Todas las amidas (RCO-NH_2) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica que es la ureasa es una enzima microbiana importante, relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Las enzimas bacterianas se clasifican en adaptativas o constitutivas. Una enzima adaptativa o inducida es aquella que es producida por una bacteria solamente cuando se encuentra presente su sustrato específico. La ureasa es una enzima constitutiva ya que la sintetizan ciertas bacterias sin tener en cuenta si hay o no el sustrato urea. El indicador de PH es rojo de fenol, el cual en alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba positiva. Si el color es amarillo indica una prueba negativa.

I. AGAR LIA

En agar LIA se determina la capacidad de un microorganismo para atacar el aminoácido LISINA descarboxilándolo o desaminándolo, la fermentación de glucosa, la producción o no de gases (CO_2), junto con la producción o no de ácido sulfhídrico (H_2S). Se lee un quebrado, la reacción ocurrida en la superficie del medio corresponde al numerador (parte aerobia) y la reacción ocurrida en la profundidad del medio corresponde al denominador (parte anaerobia). La acidez se denomina con la letra A (color amarillo) y la alcalinidad con la letra K (color púrpura). El indicador del PH del medio es PÚRPURA DE BROMOCRESOL, el cual en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color púrpura. Por contener pequeña cantidad de Glucosa (1 g/ L) al ser fermentada al fondo del tubo es amarillo y la superficie alcalina.

Muchas bacterias poseen descarboxilasas que atacan el aminoácido lisina, con liberación de aminas de reacción alcalina y con producción de CO₂. Para que actúen las descarboxilasas se requiere PH ácido que se obtiene por la fermentación de la glucosa que tiene el medio. La desaminación de la lisina es un proceso oxidativo que se manifiesta por la aparición de color rojo en el tendido, siendo el fondo del tubo amarillo por fermentación de la glucosa que posee el medio. Tiene como fuente de azufre el TIOSULFATO DE SODIO, necesario para las bacterias puedan producir H₂S y como indicador H₂S, CITRATO FERRICO DE AMONIO el cual reacciona con el H₂S produciendo un precipitado negro e insoluble de sulfato ferroso. Para que se produzca H₂S se requiere de un medio ácido por lo que dicha producción generalmente está limitada al fondo del medio, razón por la cual un fondo negro debe leerse como A (ácido), aunque el color amarillo usual esté tapado por color negro.

J. Gelatina NUTRITIVA

Este medio se utiliza para determinar la licuefacción de la gelatina y ver la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina. Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero deben ser catabolizadas en componentes más pequeños. Las enzimas exonucleares de tipo proteolítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana.

K. PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATOS

Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre. La reducción de nitrato en nitrito y en gas nitrógeno tiene lugar generalmente en condiciones anaerobias, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como un aceptor de hidrógeno. La reducción de nitrato en nitrito está indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico, p-sulfobenceno-azoalfa- naftilamina.

Reactivos adicionales:

- Alfa - naftilamina 0.05 %
- Ácido sulfanilico 0.8 %

Adicionar directamente al tubo de reacción en el siguiente orden:

1. Alfa - naftilamina 1 ml.
2. Ácido sulfanílico 1 ml.

Guardar ambos reactivos en el refrigerador mientras no se usen. Por lo general se mantienen estables durante tres meses.

L. HIDRÓLISIS DE LA ESCULINA

La hidrólisis de la esculina se determinó según Cowan & Steel's (1993). Para ello los aislamientos bacterianos son inoculados en Caldo Esculina. La esculina y el hierro se disuelven en el agua de peptona y se esteriliza a 115 °C durante 15 min. De forma general la hidrólisis de la esculina libera glucosa y esculetina y esta última se detecta porque reacciona con el ión férrico del medio dando unos precipitados negros que lo oscurecen.

M. HIDRÓLISIS DEL DNA

Los biotipos bacterianos se siembran en un agar que contiene DNA. Las bacterias que son capaces de producir DNasa despolimerizan el DNA hasta fragmentos de nucleótidos. La visualización de la despolimerización del DNA se consigue añadiendo HCl 1N sobre el microorganismo desarrollado en el medio de cultivo que contiene el DNA. El HCl precipita del DNA dando lugar a un enturbiamiento del agar. De esta manera, en las zonas donde el DNA se ha degradado no habrá precipitación y el agar queda transparente debido a que el HCl no reacciona con los fragmentos de nucleótidos. Las cepas bacterianas objeto de estudio han sido sembradas mediante una estría central gruesa en una placa Petri con agar DNA.

- Anexo 4

Lesiones de las truchas halladas en la necropsia.

	Branquias Hiperemicas	Branquias Palidas	Esplenomegalia	Exoftalmia Unilateral	Higado Congestionado	Higado Palido	Higado Petequias	Lesion en Aletas	Melanosis en Piel	Solucion de Continuidad
1	X		X	X		X		X	X	
2	X		X			X	X	X		
3	X			X		X			X	
4						X				
5	X		X	X		X		X		
6	X		X			X			X	
7			X			X	X			
8	X		X			X				
9			X			X	X			
10							X			
11			X				X	X		
12	X					X			X	
13			X	X		X				
14										
15	X		X			X				
16			X		X		X			
17			X				X	X		
18		X	X			X		X		X
19		X				X	X			X
20			X		X		X			X
21			X		X		X	X		
22		X					X	X		
23			X			X	X			X
24			X				X			
25		X	X			X				
26										
27			X				X			
28			X			X	X			
29	X		X							X
30			X			X				
F	9	4	22	8	3	18	15	8	4	5
%	30.00	13.33	73.33	26.67	10.00	60.00	50.00	26.67	13.33	16.67