

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“ESTUDIO MICROBIOLÓGICO E
HISTOPATOLÓGICO EN NEÓN TETRA
(Paracheirodon innesi) PROCEDENTE DE LA
AMAZONÍA PERUANA”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Palacios Huayta, Shirley Marie

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

A mis padres Juana y Miguel quienes con todo su apoyo, preocupación y amor incondicional, lograron hacer de mí, ahora toda una profesional. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que me inculcaron.

A mis bbs que siempre estuvieron conmigo durante este tiempo brindándome su fiel compañía y arrancándome sonrisas. Siendo la más grande motivación para ser cada día una mejor profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios por hacerme fuerte en los momentos más duros de mi vida, por haberme dado salud para lograr hacer realidad este sueño.

A mis padres, Juana y Miguel, por sus consejos, su amor por estar a mi lado y apoyarme siempre, por los recuerdos felices... porque los quiero mucho.

A mis familiares, tíos y hermanos, por enseñarme a persistir en la vida hasta lograr cumplir mis metas.

A mi directora de tesis, la Dra. Nieves Sandoval, por la confianza, apoyo y asesoramiento en toda la elaboración de mi tesis.

Al Blgo. Hamilton Chen Bueno por su apoyo y aporte en el desarrollo de la tesis.

A DACCH, por su motivación y apoyo en la realización de la tesis.

A mis amigos que demostraron estar conmigo en las buenas y malas.

Al presidente Frank Cowherd de la PVAS Foundation Grant por haber apoyado a la realización de mi tesis mediante el financiamiento económico.

Al Dr. Manuel Moro, miembro de PVAS Foundation Grant por sus invaluables e importantes sugerencias.

INDICE

DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE	vi
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. ASPECTOS GENERALES DE PECES ORNAMENTALES	2
2.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PESCA ORNAMENTAL	3
2.2.1. A nivel mundial	3
2.2.2. A nivel nacional	4
2.1.2.1. Comercialización	5
2.3. Neón Tetra (<i>Paracheirodon innesi</i>)	9
2.3.1. Clasificación taxonómica	9
2.3.2. Generalidades	9
2.3.3. Hábitat natural y Distribución	10
2.3.4. Morfología	10
2.3.5. Alimentación	11
2.3.6. Comportamiento	11
2.3.7. Reproducción	11

2.4. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL BRANQUIAS, INTESTINO, HÍGADO, RIÑÓN, Y MÚSCULO DE LOS TELEÓSTEOS	11
2.4.1. BRANQUIAS	11
2. 4. 2.INTESTINO	12
2.4.2.1. Intestino ascendente	12
2.4.2.2. Ciegos pilóricos	13
2.4.2.3. Intestino descendente	13
2.4.2.4. Recto	13
2.4.2.5. Ano	13
2.4.3 HÍGADO	14
2.4.4. RIÑÓN	15
2.4.5 MÚSCULO	16
2.4.6. BAZO	17
2.5. MECANISMOS DE DEFENSA DE LOS PECES	18
2.6. ENFERMEDADES EN PECES ORNAMENTALES	20
2.6.1. GENERALIDADES	20
2.6.2 .ENFERMEDADES DE ORIGEN INFECCIOSO	21
2.6.2.1. ENFERMEDADES BACTERIANAS	21
Enfermedad por <i>Flavobacterium columnare</i>	21
Características microbiológicas	21

Epidemiología	22
Signos clínicos	22
Lesiones	22
Enfermedad por <i>Staphylococcus epidermidis</i>	23
Características microbiológicas	23
Epidemiología	23
Signos clínicos	23
Lesiones	23
Enfermedad causada por <i>Pseudomonas sp.</i>	23
Características microbiológicas	23
Epidemiología	23
Signos clínicos	24
Lesiones	24
Enfermedad causada por <i>Carnobacterium</i>	24
<i>piscícola (Lactobacillus piscícola)</i>	
Características microbiológicas	24
Epidemiología	24
Signos clínicos	24
Lesiones	24
Enfermedad causada por <i>Enterococcus</i>	
<i>(Streptococcus) faecalis subs.liquefaciens</i>	25
Características microbiológicas	25
Epidemiología	25

Signos clínicos	25
Lesiones	25
Enfermedad causada por <i>Bacillus sp.</i>	
Características microbiológicas	25
Epidemiología	25
Signos clínicos	26
Lesiones	26
Enfermedad por <i>Edwardsiella tarda</i>	26
Características microbiológicas	26
Epidemiología	26
Signos clínicos	27
Lesiones	27
2.6.2.2. ENFERMEDADES PARASITARIAS	27
MIXOSPORIDIASIS	27
MIXOSPORIDIASIS	29
2.6.3. ENFERMEDADES DE ORIGEN NO INFECCIOSO	29
2.6.3.1. Por la calidad del agua	29
Amoníaco	29
Oxígeno disuelto	30
pH	30
2.6.3.2. Por Factores Nutricionales	30
2.6.3.3. Neoplasias	31

2.7. ESTADO SANITARIO DE LOS PECES ORNAMENTALES	
EN EL PAIS	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Lugar de Estudio	33
3.2. Material Experimental	33
Materiales	34
Materiales para la necropsia	34
Materiales para el proceso Histológico	34
Materiales para el proceso Microbiológico	35
Equipos	36
3.3 Metodología	36
3.3.1. Toma de muestras	36
3.3.2. Necropsia	37
3.3.3. Estudio microbiológico	37
3.3.4. Histopatología	39
3.3.5. Análisis de datos	40
IV.RESULTADOS	43
4.1. Microbiológicos	43

4.2. Histología	45
V.DISCUSIÓN	59
VI. CONCLUSIONES	67
VII. RECOMENDACIONES	68
VIII.LITERATURA CITADA	69
IX. APÉNDICE	80

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de agentes infecciosos mediante estudios microbiológicos e histopatológicos en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*), pez amazónico ornamental. Se colectaron al azar 168 peces de acopiadores minoristas de peces ornamentales procedentes de Iquitos. Para el estudio microbiológico se realizó la necropsia de 84 peces al azar, tomándose muestras de riñón y bazo, para el aislamiento de bacterias en Agar tripticosa de soya (TSA), Cytophaga (AO) y Middlebrook 7H9 y luego su identificación con coloración Gram, morfología y análisis bioquímico. Los 84 peces restantes fueron utilizados para el estudio histopatológico multiorgánico y la determinación de otros posibles agentes infecciosos. De las muestras de riñón y bazo, sembradas en agar TSA y AO se aislaron bacterias de géneros como: *Flavobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.* y 1 familia: *Enterobacteriaceae*; del agar Middlebrook 7H9 no se aislaron bacterias. Los hallazgos histopatológicos en branquias fueron: hiperplasia lamelar, fusión de lamelas y presencia de esporas de *Mixosporidium sp.* en los ápices de las lamelas; intestino: hiperplasia del epitelio y presencia de esporas de *Microsporidium sp.* en el enterocito; hígado: degeneración hidrópica, grasa y presencia de un granuloma parasitario en el parénquima hepático; riñones: edema peritubular y degeneración hidrópica tubular; músculo esquelético: necrosis, presencia de esporas de *Microsporidium sp.*, quiste de *Mixosporidium sp.*, esporas de *Pleistophora sp.*, *Heterosporis sp.*, granuloma parasitario y bacteriano. Se concluye: el Neón tetra, pueden ser infectado por más de un género de *Microsporidium* a la vez, identificándose por su morfología al *Pleistophora sp.* y *Heterosporis sp.* por primera vez descritos en el país. Además, de las bacterias mencionadas anteriormente, se observaron múltiples granulomas de diversos tamaños característicos en algunos procesos infecciosos de tipo bacteriano, confirmando así la presencia de bacterias en los neones tetras.

Palabras claves: Neón tetra, estudio microbiológico, estudio histopatológico, *Microsporidium sp.*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the presence of infectious agents by microbiological and histopathological studies in the Neon tetra (*Paracheirodon innesi*), an amazonian ornamental fish. A number of 168 fish were randomly collected by ornamental fish's retail collectors, from Iquitos. For microbiological study, were performed the necropsy of 84 randomly fish, taking samples of kidney and spleen, for the isolation of bacteria in trypticase soy agar (TSA), Cytophaga (AO) and Middlebrook 7H9 and bacterial identification with Gram staining, morphology and biochemical analysis. The remaining 84 fish were used for histopathological study and identification of emerging infectious agents. The samples of kidney and spleen, seeded on TSA and AO agar, bacteria genera were isolated as: *Flavobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* and a family: *Enterobacteriaceae.*; no bacteria were isolated Middlebrook agar. The histopathological findings were laminar gills hyperplasia, fusion of lamellae and Mixosporidias spores were observed at the tips of the lamellae; epithelial hyperplasia of the bowel and spores *Microsporidium sp.* in the intestinal villi ; in the liver: hydropic and fatty degeneration and a parasitic granuloma in the liver parenchyma; kidney's peritubular edema and hydropic degeneration; muscular skeletal:necrosis , the presence of *Microsporidium sp.* cysts, *Mixosporidium sp.* Cysts , *Pleistophora sp.* Spores, *Heterosporis sp.*, parasitic and bacterial granuloma. We conclude that the study the Neon tetra can be infected by more than one microsporidia species simultaneously identified by their morphology including to gender *Pleistophora sp.* and *Heterosporis sp.* first described in the country. Furthermore, the aforementioned bacteria, were observed multiple granulomas of various sizes characteristic in some infectious processes of bacterial type, confirming the presence of bacteria in the neon tetras.

Keys words: Neon tetra, microbiological study, histopathological study, *Microsporidium sp.*

Comentario [as1]:

Comentario [as2]:

Comentario [as3]: epithelial hyperplasia of the bowel

Comentario [as4]: of *Microsporidium sp* cysts

Comentario [as5]: = ant

Comentario [as6]: Parasitic (1/84) and bacterial (1/84) granuloma

Comentario [as7]: *Pleistophora sp.* spores

Comentario [as8]: Parasitic (1/84) and bacterial (1/84) granuloma

Comentario [as9]: Parasitic (1/84) and bacterial (1/84) granuloma

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Peces ornamentales amazónicos del Perú que presentan mayor demanda de exportación
- Cuadro 2.** Valor de las exportaciones peruanas de peces ornamentales y sus principales destinos para el año 2006
- Cuadro 3.** Clasificación de la lesión según el grado de afección por su extensión
- Cuadro 4.** Clasificación de la Degeneración Grasa de acuerdo a severidad y extensión de la lesión
- Cuadro 5 .** Géneros y Familia bacterianos aislados de riñón y bazo en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú
- Cuadro 6.** Frecuencia de alteraciones histológicas de las branquias según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú
- Cuadro 7.** Frecuencia de alteraciones histológicas del Intestino según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú
- Cuadro 8.** Frecuencia de alteraciones histológicas del hígado según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú
- Cuadro 9:** Frecuencia de alteraciones histológicas del Riñón según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú
- Cuadro 10:** Frecuencia de alteraciones histológicas del músculo esquelético según tipo de trastorno en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedentes de Iquitos-Perú

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Familias de peces ornamentales amazónicos de mayor comercialización

Figura 2. Países importadores de peces ornamentales amazónicos

Figura 3. (a) Neón Tetra (*Paracheirodon innesi*), (b) Tetra cardenal (*Paracheirodon axelrodi*)

Figura 4. (a) Neón tetra en recipientes antes del sacrificio. (b) Corte medular. (c) Toma de muestras de los órganos riñón y bazo. (d) Sembrado en placas

Figura 5. (a) y (b) Colocación de los peces en los cassettes histológicos. (c) Conservación en formol bufferado al 10%

Figura 6. Branquias - Se observan en el ápice de las lamelas esporas de *Mixosporidium sp.* (Flechas) H &E 100X

Figura 7. Branquias - Hiperplasia epitelial (Flecha A) y fusión de lamelas (Flecha B). H &E 40X

Figura 8. Branquias - Hiperplasia epitelial y fusión de filamentos branquiales (Flechas). H &E 40X

Figura 9. Intestino - Hiperplasia e incremento del mucus en la luz (Flechas) .H&E. 100X

Figura 10: Intestino - Se observa presencia de esporas de *Microsporidium sp* en las vellosidades intestinales (Flechas). H&E. 100X

Figura 11. Hígado - Se observan los hepatocitos hinchados con uni-multivacuolas intracitoplasmáticas desplazando al núcleo a la periferie (Flechas). Degeneración grasa Grado 4. H&E 40X

Figura 12. Hígado - Granuloma parasitario (Flecha negra). Se observa externamente fibroblastos con melanomacrófagos (Flecha A) que rodean al parásito que se encuentra internamente(Flecha B). H&E 100X

Figura 13. Riñón- Edema peritubular (Flecha A) y degeneración hidrópica (Flecha B).
H&E 100X

Figura 14. Riñón. Edema peritubular (Flecha). H&E. 100X

Figura 15. Presencia de esporas de *Microsporidium sp.* (Flecha A) H &E 40X
Necrosis (Flechas B) H &E 100X

Figura 16. Músculo esquelético - Necrosis(Flecha). H&E 100X

Figura 17. Músculo esquelético - Necrosis y presencia de quistes de *Microsporidium sp.*
(Flechas) H &E 40X

Figura 18. Músculo esquelético - Quiste de *Mixosporidium sp.* (Flecha). H &E 100X

Figura 19. Músculo esquelético - Esporas de *Pleistophora sp.* (Flecha). H &E 100X.

Figura 20. Músculo esquelético - *Heterosporis sp.* (Flecha) H &E (A) 40X (B) 100X

Figura 21. Músculo esquelético Granuloma parasitario (Flecha negra).Externamente se observa fibroblastos y escasos melanomacrófagos (Flecha A) rodeando a una cercaría(Flecha B).
H &E 100X.

Figura 22. Granuloma parasitaria (Flecha negra). Obsérvese la distribución de fibroblastos que han reemplazado a los macrófagos (B) alrededor de un parásito (C).
H &E (A) 10X (B) 40X (C) 100X.

Figura 23. Granuloma bacteriana (Flechas). H &E 100X.

APÉNDICE

ANEXO 1: Tinción GRAM

ANEXO 2: Pruebas Bioquímicas

ANEXO 3: Protocolo para el procesamiento de muestras para histopatología

I.INTRODUCCIÓN

La explotación de los peces ornamentales amazónicos se ha convertido en una actividad económicamente rentable en estos tiempos, dada su gran demanda nacional e internacional. Por lo tanto, se tiene que asegurar un producto de buena calidad para mantener dichos mercados. Diversos eventos relacionados al medio ambiente o de manejo siempre van a conducir a alteraciones en la salud de los peces y los factores que la alteran estarán relacionados a enfermedades de tipos infecciosas y no infecciosas.

Dentro del grupo de enfermedades infecciosas que afectan la salud de los peces ornamentales amazónicos figuran las enfermedades bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias que a menudo ocasionan lesiones externas y/o internas que al final pueden ocasionar la muerte y ser una fuente de dispersión de la enfermedad en el agua. Las bacterias relacionadas con enfermedad pueden provenir de la flora bacteriana de los peces así como bacterias introducidas por una mala práctica en el manejo; esto sumado a alguna condición estresante de los peces, los convertiría en susceptibles de padecer alguna infección. Algunas bacterias a la vez pueden tener cierta capacidad zoonótica ocasionando algún problema en la salud pública.

En el presente trabajo, se realiza un estudio microbiológico e histopatológico en Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedentes de la amazonia peruana.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GENERALES DE PECES ORNAMENTALES

Se define como peces ornamentales aquellos grupos de peces dotados de características estéticas peculiares que son criados bajo todos los cuidados permanentes en acuarios y/o estanques (Panné y Luchini, 2008), simulando lo más posible el ambiente natural de donde proceden.

Livengood y Chapman (2007) lo definen como un término genérico usado frecuentemente para describir los animales acuáticos mantenidos en un acuario manejados por aficionados, en el que se incluyen peces, corales, crustáceos, moluscos y la piedra viva que servirá como un filtro natural en el acuario.

La crianza de peces ornamentales o peces mascota es una actividad que ha existido por miles de años, en la cual mucha gente ha encontrado satisfacción por tener amplia variedad de especies, no sólo por su belleza, sino por tener una pequeña parte del mundo en casa (British Veterinary Association Animal Welfare Foundation, 2009; Miller-Morgan, 2010).

La historia de la crianza de los peces ornamentales se remonta a la antigua Roma del siglo II después de Cristo (d.C) donde se elaboraron estanques para peces ornamentales marinos. Alrededor de 619-917 d.C los chinos desarrollaron técnicas de crianza y mantenimiento de los goldfish (*Carassius auratus*), y cerca de 960 d.C, los

goldfish ya eran mantenidos como mascotas domésticas en estanques. En siglos posteriores los goldfish eran criados dentro de tazones de fantasía y alrededor de 1548 ya era una afición popular en China, y de ahí probablemente avanzó a Japón dado que en el siglo XVI su crianza ya estaba bien establecida. La introducción de esta especie en Europa empezó probablemente en Portugal avanzando luego a Gran Bretaña. En 1700 ya era una afición popular en el continente europeo. La llegada de esta afición a los Estados Unidos empezó a mitad de 1850, y en 1865 ya había una tienda de venta de peces en Nueva York. En el siglo XX esta actividad, ya consolidada como industria, siguió expandiéndose con el incremento de la importación de peces exóticos, crianza de peces en estanques, producción en granjas de muchas especies y el mejoramiento de técnicas para el viaje de largas distancias (Fossá, 2004; Miller-Morgan, 2010).

La British Veterinary Association Animal Welfare Foundation (2009) menciona que los peces ornamentales pueden ser divididos dentro de dos categorías:

1- Los peces de agua dulce, que se pueden subclasificar en peces de agua fría como por ejemplo los goldfish, carpas koi y los peces tropicales tales como los tetras, gouramis, y los peces amazónicos.

2- Peces marinos o de agua salada; son generalmente peces tropicales como los peces payaso, peces cirujano, etc.

Según el tipo de la especie ornamental a criar se tiene que tener en cuenta el tipo de alimento, la densidad del espacio, la convivencia con otras especies en el mismo acuario o estanque y las condiciones mínimas que debe cumplir el medio acuático para asegurar su bienestar y supervivencia (British Veterinary Association Animal Welfare Foundation, 2009).

2.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PESCA ORNAMENTAL

2.2.1. A nivel mundial

La demanda de peces ornamentales por los aficionados a los acuarios es un actividad económica creciente. Anualmente, a escala mundial, se comercializan más de 150 millones de peces ornamentales de agua dulce y marina (Gallo, 1999). En cuanto a la

crianza de especies de agua dulce a nivel mundial, se incluyen los neón tetra (*Paracheirodon innesi*), guppy (*Poecilia reticulata*), goldfish (*Carassius auratus*), black molly (*Poecilia latipinna*), gouramí (*Trichogaster trichopterus*), y otras especies que tienen gran demanda a nivel mundial y que ya han sido reproducidos bajo 108 sistemas de la acuicultura (Ling y Lim, 2006).

2.2.2. A nivel nacional

El Perú es uno de los tres países de Sudamérica que realiza más exportaciones de peces ornamentales, por detrás de Brasil y Colombia respectivamente, siendo los peces extraídos de la selva peruana, sobretodo en el departamento de Loreto donde se encuentran las medianas y grandes empresas exportadoras (Huanqui, 2005).

En nuestro país, la actividad de comercialización del recurso peces ornamentales se inicia a partir de la década del cincuenta, desde la ciudad de Iquitos hacia el exterior, en ese entonces principalmente a la ciudad de Miami-EUA (Rojas, 1972). Posteriormente sobre todo en la década (1975-1985), se abrieron nuevos mercados para exportación a Japón, Alemania, Holanda, Suecia, China (DIREPE/MIPE, 1986). En relación a nivel de extracción de peces ornamentales, en las diferentes cuencas, éste ha ido variando a través del tiempo. La cuenca del río Napo fue la más importante en la década de los 70, la cuenca del Nanay en la década de los 80 y la cuenca del Ucayali en la década de los 90 hasta la actualidad. Siendo, la cuenca del Ucayali la más importante productora, en términos de volumen, sobre todo de especies de la familia Calíctidos y Loricáridos; y la cuenca del Nanay es la más importante en términos de diversidad de especies de peces ornamentales (Ruíz *et al.*, 2003).

Entre las principales familias de peces ornamentales que encontramos en el territorio peruano destacan los Potamotrygonidae, Osteoglossidae, Characidae, Loricaridae, Pimelodidae y Cichlidae (Nelson, 2006).

En el 2008, se analizó el estado actual de los peces ornamentales en el Perú obteniendo una lista con los 10 peces ornamentales peruanos de mayor demanda de exportación (Cuadro N 1). Ordenada en forma decreciente, siendo la primera especie, la de mayor demanda y así sucesivamente (Ortiz y Iannacone, 2008).

Cuadro 1. Peces ornamentales amazónicos del Perú que presentan mayor demanda de exportación.

Nombre científico	Familia	Nombre común
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	Osteoglossidae	Arawana
<i>Potamotrygon motoro</i>	Potamotrygonidae	Raya Motoro
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Potamotrygonidae	Raya Tigre
<i>Acanthicus adonis</i>	Loricariidae	Pleco Adonis
<i>Peckoltia vittata</i>	Loricariidae	Pleco Vitala
<i>Brachyplatystoma tigrinum</i>	Pimelodidae	Suburí Tigre
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	Cichlidae	Disco Verde
<i>Lamontichthys filamentosus</i>	Loricariidae	Shitari
<i>Corydoras julii</i>	Callichthyidae	Coridora Julii
<i>Corydoras arcuatus</i>	Callichthyidae	Coridora Arcuatus

Fuente: Ortiz *et al.* , 2008

2.1.2.1. Comercialización

El Perú comercializa principalmente peces extraídos del medio natural, específicamente de la cuenca del Amazonas. Perú exportó entre los años 1999 - 2003 entre 8 -11 millones de unidades, correspondientes a 36 familias y se registraron unas 772 especies. Para el año 2001 el valor de exportación alcanzó los 2, 5 millones de dólares, con más de 9 millones de peces exportados (Panné y Luchini, 2008)

En el 2003, tres familias de peces ornamentales (Loricariidae, Callichthyidae y Characidae), representaban el 70,64 % del comercio de este recurso (Figura 1) (BTFFP, 2005).

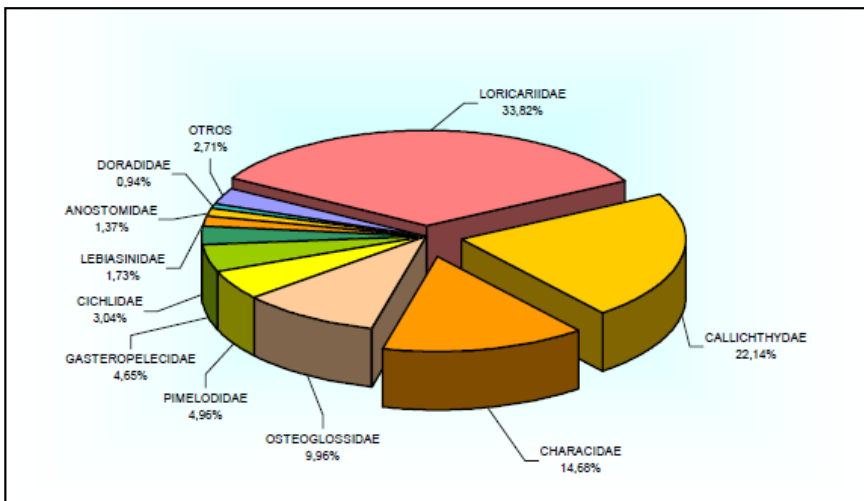


Figura 1. Familias de peces ornamentales amazónicos de mayor comercialización.

Fuente: Comisión para la promoción de las Exportaciones –PROMPEX, 2004

Ya para el 2006, las exportaciones habían superado los 3 millones de dólares. Existen 28 empresas oficialmente inscritas y habilitadas para exportar peces ornamentales destinados a 48 diferentes países, con una mayor parte de este destino, hacia los Estados Unidos (más del 55%), vía Miami y Los Ángeles ; Asia(cerca del 20%), vía Tokyo y Hong Kong. Los valores de las exportaciones de peces ornamentales pueden observarse en el Cuadro 2 (Panné y Luchini, 2008).

Cuadro 2. Valor de las exportaciones peruanas de peces ornamentales y sus principales destinos para el año 2006

Destinos	Valor en U\$S
Hong Kong	803 570
Estados Unidos	701 300
Japón	566 792
Taiwán	240 868
Alemania	198 981
Reino Unido	159 843

Fuente: Panné y Luchini 2008

En el año 2010, la comercialización de peces ornamentales vivos en la región de Loreto fue 7.194 TM. Siendo destinados 7.083 TM al mercado externo, siendo Hong Kong, EEUU y Japón los principales países importadores. La exportación de peces ornamentales alcanzó los US\$ 3,641.000 para ese mismo año (Cumbicus y López, 2011).

Por el lado de los importadores, el ranking mundial lo lidera Estados Unidos (24%), el Japón (14%) y los países de la Unión Europea, en especial Alemania (9%), Francia (8%) y el Reino Unido (8%) (BTFP, 2005).

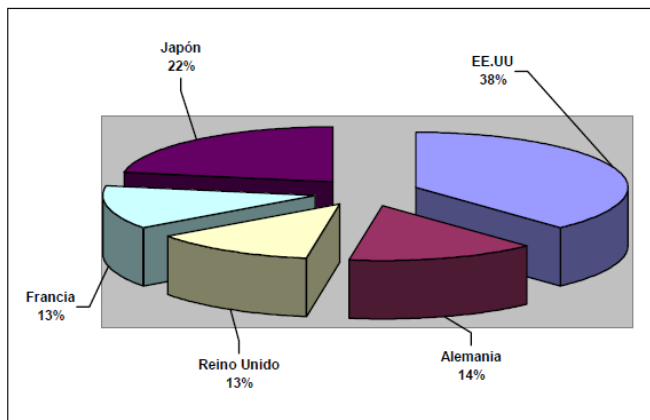


Figura 2. Países importadores de peces ornamentales amazónicos

Fuente: Comisión para la promoción de las Exportaciones –PROMPEX, 2004

La producción de peces ornamentales ofrece una alta rentabilidad y fuente de empleo dado que pequeños pescadores se dedican a su extracción natural. Éstos los venden a los acopiadores independientes o que trabajan con los grandes exportadores y finalmente éstos juntan los peces por lotes y los llevan a su destino final, elevándose el precio de los mismos en cada nivel de la cadena productiva (Livengood y Chapman, 2007; La Torre y Brunner, 2007), constituyéndose la actividad pesquera ornamental en una importante fuente de ingreso de divisas para el país y de sustento para miles de familias dedicadas a este rubro del quehacer económico regional (Rojas, 1972; San Román *et al.*, 1977 y Chong *et al.*, 2003).

2.3. Neón Tetra (*Paracheirodon innesi*)

2.3.1. Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Clase: Actinopterygii

Superorden: Ostariophysi

Orden: Characiformes

Familia: Characidae

Género: *Paracheirodon*

Especie: *P. innesi*

Myers, 1936

2.3.2. Generalidades

Es originario del oeste de Sudamérica. Es una especie muy apreciada en acuariofilia. Apreciados por su carácter pacífico, su llamativo colorido y sus desplazamientos en cardumen, dan movimiento y vida a todo acuario. Su característica principal es una franja azul fosforescente que recorre su cuerpo desde el morro hasta la aleta adiposa. La parte inferior es de un rojo luminoso que se extiende desde la parte anterior hasta la mitad de su cuerpo en el Neón tetra (Figura 3a), a diferencia del Tetra cardenal (Figura 3b), que llega desde el morro hasta el pedúnculo de la aleta caudal. Se encuentran en temperaturas entre 21°C y 28°C. No soportan bien temperaturas superiores. Pueden vivir entre 6 y 7 años (Herbert y Dauner., 2002).

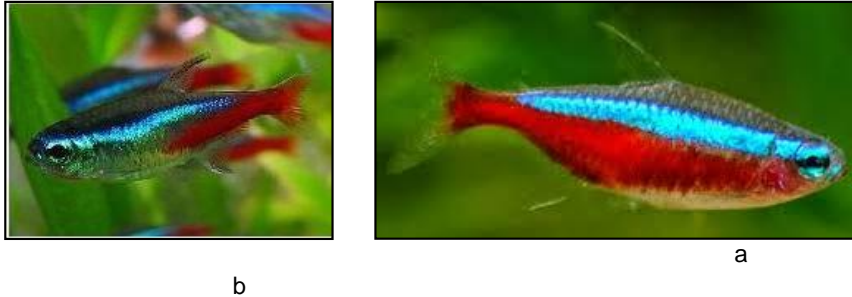


Figura 3. (a) Neón Tetra (*Paracheirodon innesi*), (b) Tetra cardenal (*Paracheirodon axelrodi*).

Fuente: Herbert *et al.*, 2002.

2.3.3. Hábitat natural y Distribución

En su hábitat, el agua en que se hallan estos peces, es bastante oscura, algo así como del color del té, debido a la alta concentración de taninos y hojas muertas que se precipitan al agua, no obstante es claro y límpido. Además, el agua en estas regiones es muy blanda, esto sucede debido a que los taninos disueltos por la descomposición de la vegetación, capturan el calcio que se deposita en el lecho rocoso. Adicionalmente provocan que la acidez descienda por debajo de niveles de pH 4.5 y 5.5 (Petracini, 2013).

Se encuentran en el curso principal del Río Amazonas y tributarios en Brasil, Colombia y Perú. Tal es así que en Brasil: ríos Tapaua, Purus y Salimoes. En Colombia: río Loreto. En Perú: ríos Putumayo y Ucayali (Petracini, 2013).

2.3.4. Morfología

Cuerpo de forma ahusada, aletas transparentes con la aleta anal un tanto más larga y fina que la dorsal. Posee una pequeña aleta adiposa detrás de la dorsal que lo ayuda a estabilizar la natación. Ojos brillantes de un color azul verdoso con destellos dorados. La boca está repleta de diminutos dientes, algo que recuerda que, pese a su inofensivo aspecto y comportamiento, morfológicamente es un pariente muy cercano de las pirañas, con las que comparten familia. No supera los 4 cm (Portal acuariofilia, 2013).

2.3.5. Alimentación: Omnívoro. Tiene especial predilección por el alimento vivo, como artemia salina, tubifex, larvas de mosquito, daphnias y pequeños gusanillos. También toma alimento liofilizado (Herbert *et al.*, 2002).

2.3.6. Comportamiento: Muy pacífico. Para que luzcan deben ser mantenidos en grupos de por lo menos 10 ejemplares. Los ejemplares dominantes ocupan siempre la posición central en el cardumen y los inferiores la exterior (Herbert *et al.*, 2002).

2.3.7. Reproducción: Complicada para el aficionado, aunque posible, sólo en agua muy blanda de GH=1-2ºd con un pH 5.0-6.0 en acuarios oscurecidos. Temperatura 26°C.

Los alevines nacerán a las 24 h de la puesta, y llegarán a nadar a los 5 días. Luego de que hayan consumido el saco vitelino, se deberán alimentar con infusorios durante los primeros días y luego con naupilos de artemia. Se deberá tener especial cuidado en retirar paulatinamente los papeles que protegen dicho acuario de la luz, (uno cada 24 o 48 h) ya que los alevines son lucífugos. A las tres semanas pueden alimentarse con larvas de mosquitos tamizadas por una red de tul, pulgas de agua (el alimento ideal) y se puede intentar con las microescamas para peces, previamente hidratadas con agua tibia. A los 45 días ya pueden comer escamas molidas y casi todos los demás alimentos para peces de ese tamaño, incluyendo tubifex picado. A partir de los 90 días tendrán un tamaño suficiente como para ser incorporados a los acuarios comunitarios de tetras (El alquimista de los acuarios, 2013).

2.4. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE BRANQUIAS, INTESTINO, HÍGADO, RIÑÓN, BAZO Y MÚSCULO DE LOS TELEÓSTEOS

2.4.1 BRANQUIAS

Es un órgano que presenta varias funciones, entre ellas destacan el intercambio gaseoso, osmoregulación, equilibrio ácido-base y excreción de productos nitrogenados (Noga, 2000; Evans *et al.*, 2005). Se encuentra irrigado por la arteria branquial aferente que proviene de la aorta ventral, diseminándose la sangre a través de capilares para

oxigenarse en las laminillas secundarias, luego la sangre oxigenada en los capilares confluye en la arteria branquial eferente, la cual se dirige a la arteria aorta dorsal para irrigación sistémica (Evans *et al.*, 2005).

Están formadas en la mayoría de los teleósteos por cuatro a cinco arcos branquiales, ubicados a cada lado de la faringe, en el borde posterior de cada arco branquial se proyectan los filamentos branquiales o laminillas primarias, las cuales para aumentar la superficie respiratoria presentan laminillas secundarias dispuestas en la parte superior e inferior de cada filamento (Amlacher, 1961; Ellis, 1981).

La superficie de las branquias está cubierta con un epitelio simple plano, presentando tres tipos de células: células pavimentosas, un menor número de células del cloro, estas últimas de forma redondeadas o poligonales, acidófilas, con numerosas mitocondrias y ubicándose en el extremo proximal de las laminillas secundarias, y células mucosas dispuestas en las laminillas y en el epitelio basal. También se describen las células pilares, que soportan los múltiples capilares distribuidos en las laminillas secundarias (Hibiya *et al.*, 1982; Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2005).

2.4.2 .INTESTINO

2.4.2.1. Intestino ascendente

El intestino ascendente se caracteriza por presentar vellosidad intestinal revestida por un epitelio de absorción, prismático simple con microvellosidades y células caliciformes. El estrato granuloso y el compacto están muy desarrollados (Cepeda y Orostegui, 2000). La muscular de la mucosa y la submucosa están ausentes. La capa muscular se encuentra inmediatamente por debajo de la lámina propia (Hibiya *et al.*, 1982; Cepeda y Orostegui, 2000).

La capa muscular lisa propia presenta gran desarrollo de la circular interna, en cambio, la longitudinal externa es delgada (Cepeda y Orostegui, 2000).

2.4.2.2. Ciegos pilóricos

Del intestino ascendente, se originan numerosos divertículos denominados ciegos pilóricos. Los ciegos son, histológicamente, similares al intestino ascendente, pero difieren por tener una pared más delgada. Se han descrito entre 36 a 57 divertículos en la trucha café, y entre 51 a 82 en la trucha arcoíris (Cepeda y Orostegui, 2000).

2.4.2.3. Intestino descendente

Es similar al intestino ascendente, sin embargo, la túnica muscular es más delgada (Hibiya *et al.*, 1982; Cepeda *et al.* 2000). La cantidad de células secretoras de mucus es menor que en el ascendente, por lo que es posible visualizar mejor las células prismáticas o columnares altas del epitelio de revestimiento (Cepeda y Orostegui, 2000).

2.4.2.4. Recto

Se caracteriza por la presencia de pliegues anulo-espinales, que se proyectan desde las paredes hacia el lumen. Los pliegues son bajos, estructurados por un epitelio prismático simple, con células mucosas y por una musculatura lisa circular gruesa, que en algunos peces forma un verdadero esfínter en la unión con el intestino descendente (la válvula de ileorrectal) (Hibiya *et al.*, 1982; Cepeda y Orostegui, 2000).

El estrato granuloso, el compacto, muscular de la mucosa y la submucosa están ausentes (Hibiya *et al.*, 1982; Cepeda y Orostegui, 2000).

Las funciones parecen estar relacionadas con la absorción de agua y secreción de mucus (Cepeda y Orostegui, 2000).

2.4.2.5. Ano

Corresponde a la abertura terminal del tubo digestivo. En la zona de transición del ano con el exterior, el epitelio prismático simple se transforma gradualmente en pluriestratificado, que se continúa con el de la epidermis. El epitelio, que reviste la mucosa del ano, en las proximidades del recto, es abundante en células mucosas.

La túnica muscular lisa se dispone en 2 planos: circular interna y longitudinal externa. La circular es gruesa y forma un esfínter (Cepeda y Orostegui, 2000).

2.4.3 HÍGADO

Se encuentra ubicado en la parte anterior de la cavidad peritoneal, presenta un color marrón a rojo vinoso. El hígado está presente como un órgano simple en varios teleósteos pero en algunas especies se ha observado que el tejido pancreático se ubica alrededor de la vena porta o sus ramificaciones, llamándosele hepatopáncreas (Ellis *et al.*, 1981; Hibiya *et al.*, 1982). Su superficie está cubierta por una membrana serosa de tejido conectivo que se extiende hacia el parénquima (Hibiya *et al.*, 1982; Noga, 2000).

Al igual que en los mamíferos, la arteria hepática y la vena porta ingresan al hígado, ésta última trae sangre venosa proveniente del estómago e intestino para luego ramificarse en capilares llamados sinusoides (Hibiya *et al.*, 1982; Akiyoshi e Inoué, 2004). Entre los sinusoides se encuentran los hepatocitos, que pueden estar dispuestos a manera de cordones, túbulos o en varias capas, según estudios de la arquitectura hepática realizados en diferentes especies de teleósteos (Akiyoshi e Inoué, 2004). Los hepatocitos son poligonales, prominente núcleo esférico central, un nucleolo, organelas, y alto contenido de glucógeno y lípidos en el citoplasma (Ellis *et al.*, 1981; Hibiya *et al.*, 1982, Vicentini *et al.*, 2005).

Las venas centrales y tríadas portales encontradas en los mamíferos, no son claramente identificadas en algunas especies de peces (Rocha *et al.*, 1994).

Los conductos biliares se ubican cerca a la vena porta, son canalículos intracelulares e intercelulares que forman el conducto biliar, el cual se une al conducto hepático que desemboca en el duodeno; en varias especies de peces el conducto hepático tiene una ramificación que desemboca en la vesícula biliar, llamada conducto cístico (Hibiya *et al.*, 1982, Vicentini *et al.*, 2005).

Histológicamente las paredes de los conductos biliares están revestidas por un epitelio cúbico simple, soportado por una capa de tejido conectivo y fibras musculares (Hibiya *et al.*, 1982; Vicentini *et al.*, 2005), se ha observado la presencia de melanomacrófagos alrededor de canalículos biliares, arterias y venas; así mismo la

ausencia de células de Kupffer (Ellis *et al.*, 1981; Rocha *et al.*, 1994).

2.4.4. RIÑÓN

Se encuentra ubicado retroperitonealmente, hacia arriba y adosado en la región ventral de la columna vertebral, presenta un color marrón, rojo oscuro o negro (Ellis *et al.*, 1981; Noga, 2000; Reimshuessel, 2001), su anatomía puede variar según las especies de teleosteos, pudiendo ser lobulado o fusionado, haciéndose esta variación más marcada entre especies de agua dulce y especies marinas (Reimshuessel, 2001).

La porción anterior del riñón denominada cabeza, posee tejido hematopoyético, linfoide y endocrino; y la parte posterior denominada cuerpo posee tejido excretor rodeado de tejido hematopoyético y linfoide (Reimshuessel, 2001; Meyer *et al.*, 2002).

El tejido intersticial ubicado en la parte anterior y entre los túbulos de la parte posterior del riñón está compuesto por tejido hematopoyético, conteniendo glóbulos rojos en diferentes estados de mitosis, sinusoides, capilares, centros melanomacrófagos, pigmentos de hemosiderina y melanina (Hibiya *et al.*, 1982; Meyer *et al.*, 2002).

En la mayoría de los peces el nefrón se encuentra formado por el corpúsculo renal (Glomérulo y cápsula de Bowman), el túbulo renal (cuello, segmentos proximales, un segmento intermedio, y un segmento distal que está ausente en peces marinos) y los túbulos colectores (Hibiya *et al.*, 1982).

El corpúsculo renal está formado por el glomérulo y la cápsula de Bowman formada por una capa parietal de tejido epitelial plano simple y una visceral formada por células con prolongaciones llamadas podocitos, las cuales se adhieren a los capilares del glomérulo (Hibiya *et al.*, 1982). El segmento del cuello está revestido por una capa de epitelio columnar simple ciliado, el segmento proximal se divide en los segmentos I y II; el primero está revestido por epitelio columnar simple ciliado con abundantes microvellosidades, el núcleo es oval o esférico y puede estar ubicado en posición central o basal, el segundo segmento es similar al primero, diferenciándose sólo en un mayor

diámetro de los túbulos, lumen estrecho y mayor cantidad de mitocondrias. El segmento distal no presenta casi microvellosidades en su epitelio, el núcleo es oval o esférico y en posición basal, estas características se mantienen en los tubúlos colectores (Ellis, 1981; Hibiya *et al.*, 1982).

2.4.5 MÚSCULO

Al igual que el músculo de otros vertebrados, el de los teleósteos está compuesto por fibras musculares. Se reconocen dos clases de músculo: liso y estriado, dividiéndose este último en esquelético y cardíaco (Hibiya *et al.*, 1982).

La musculatura lateral es un típico ejemplo del músculo estriado en teleósteos, consistiendo en capas de fibras musculares dispuestas a ambos lados del cuerpo desde la cabeza hacia la cola. El tejido conectivo se halla dispuesto entre el tejido muscular formando mioseptos. Los peces poseen dos tipos de fibras locomotoras dispuestas en capas: Fibras rojas o lentas y fibras blancas o rápidas; también existe una capa de fibras intermedias (Altringham y Ellerby, 1999; Ellerby *et al.*, 2000; Rescan *et al.*, 2001; Kiessling *et al.*, 2006). Las fibras están compuestas de sarcoplasma, miofibrillas, núcleo y sarcolema. El núcleo está siempre ubicado al lado del sarcolema, puede haber más de un núcleo en una fibra muscular. Las fibras rojas o de contracción lenta son altamente vascularizadas, alta cantidad de mitocondrias, gotas lipídicas y reservas de glucógeno. También alta concentración de mioglobina y citocromos. A diferencia de éstas, las fibras blancas o de contracción rápida con baja cantidad de mitocondrias, gotas lipídicas, glucógeno y mioglobina; son de pobre vascularización (Hibiya *et al.*, 1982; Kiessling *et al.*, 2006).

2.4.6. BAZO

Es un órgano de color rojo oscuro a negro de forma discoidal, localizado entre la curvatura mayor del estómago (o de la flexura del intestino) y la vejiga natatoria, está adherido a la vena portohepática. La superficie está cubierta por un mesotelio que recubre una cápsula delgada de tejido conectivo fibrilar denso. No se observan trabéculas y el tejido conectivo es escaso excepto alrededor de las venas y arterias. Por lo general, es un órgano no lobulado, pero en algunas especies puede presentar 2 o más lóbulos pequeños (Hibiya *et al.*, 1982; Cepeda y Orostegui, 2000).

En la mayoría de peces, el bazo actúa como:

- Órgano hematopoyético, principalmente linfopoyético
- Destructor de células sanguíneas (hemocatéresis)
- Almacenamiento de glóbulos rojos
- Filtración y fagocitosis
- Órgano relacionado con la respuesta inmune.

En los peces se observan algunas diferencias en relación a otros vertebrados:

- La pulpa blanca (PB) y roja (PR) son difusas. No hay una distinción clara entre la pulpa roja y pulpa blanca.
- El tejido conectivo es escaso, no forma trabéculas al interior del órgano y no presenta tejido muscular, como en los mamíferos.
- En los peces juveniles y viejos, la PB y PR es más ordenada y más fácil de ver, que en los peces adultos.

La pulpa blanca es difícil de distinguir en los individuos adultos y se puede observar más fácilmente, cuando la pulpa roja tiene escasa cantidad de sangre. Los corpúsculos esplénicos, rodean las arterias en el interior del bazo. La PB es más basófilo que la PR porque sus células están más juntas y con escasos eritrocitos. En algunas especies, hay centros germinativos separados de la arteria de la PB y también es posible observar hemosiderina en el corpúsculo esplénico. La PR está compuesta por sinusoides

lentos de sangre. La pared de los sinusoides está formada por fibras de reticulina y tienden a ordenarse circularmente alrededor de los corpúsculos esplénicos (Cepeda y Orostegui, 2000).

2.5. MECANISMOS DE DEFENSA DE LOS PECES

Al igual que todos los vertebrados, los peces tienen órganos centrales de respuesta inmune con sus particularidades (Tort *et al.*, 2003). La mayoría de órganos primarios y secundarios presentes en mamíferos se encuentran en los peces, a excepción de los nódulos linfáticos y la médula ósea, por lo cual la hematopoyesis se realiza en el riñón anterior y bazo (Huttenhuis, 2005).

El timo, el riñón y el bazo son los más importantes órganos linfoides en teleósteos (Zapata *et al.*, 2006). El timo es un órgano situado cerca de la cavidad opercular, que produce linfocitos T encargados del rechazo de injertos, estimulación de la fagocitosis y estimulación de la producción de inmunoglobulinas producidas por las células B (Tort *et al.*, 2003). Se ha observado linfocitos en división en el riñón y en el timo, lo que sugiere que estos órganos sean primarios. En el bazo se han observado menos linfocitos, lo que sugiere un rol secundario en la respuesta inmune (Ellis, 1981).

El riñón anterior no tiene función renal, además de la función hematopoyética y de respuesta inmune, esta porción tiene función endocrina; liberando corticosteroides y otras hormonas, la porción media y posterior tienen función renal y de respuesta inmune (Reimschuessel, 2001; Zwollo *et al.*, 2005).

Las células inmunes de los peces muestran las mismas características que otros vertebrados, habiéndose determinado familias de células linfoides y mieloides; no obstante, todavía hay controversia respecto a su clasificación (Hibiya *et al.*, 1982; Tort *et al.*, 2003). La inmunidad en peces puede ser no específica, o específica adquirida. Siendo de mayor importancia la primera. (Swain *et al.*, 2007).

El mucus es la primera barrera física de los peces, en la mayoría cubriendo las superficies externas, principalmente la piel, aislando al pez de los microorganismos que se encuentran en el agua. Forma parte del mecanismo inmune innato y actúa como una

barrera química ya que contiene enzimas, complemento y anticuerpos que eliminan los agentes patógenos (Kinkelin *et al.*, 1991; López - Dóriga y Martínez, 1998). La lisozima es uno de las principales enzimas estudiadas en peces, es liberada por leucocitos y posee la capacidad de actuar en las paredes celulares de las bacterias provocando la lisis de éstas, y aumentando en situaciones de estrés (Tort *et al.*, 2003). Otros mediadores inmunes son las lectinas, éstas proteínas tienen la habilidad de unirse a carbohidratos presentes en las paredes celulares, y relacionadas a la activación del sistema de complemento (Tort *et al.*, 2003).

El sistema de complemento es importante en la respuesta inmune innata de los peces, ya que a diferencia de los mamíferos los peces poseen varias isoformas activas de la molécula C3 (Tort *et al.*, 2003), relacionado a la capacidad de reconocimiento inmune innato, para así reforzar su grado de respuesta ante patógenos (Sunyer *et al.*, 1997).

La respuesta inmune específica o adaptativa está representada por la Ig M, la principal inmunoglobulina encontrada en peces (Sunyer *et al.*, 1997). Es una Ig M tetramérica, siendo diferente a la estructura pentamérica de la Ig M de mamíferos, no habiendo evidencia de diversidad de inmunoglobulinas, como en los mamíferos (Ellis, 1981; Hordvik *et al.*, 1999; Tort *et al.*, 2003).

Las citoquinas son importantes para la activación de mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa, se han estudiado poco en peces, habiendo sido caracterizada la interleucina 1 β en peces cartilagosos y óseos al igual que en mamíferos, anfibios y aves (Mulero *et al.*, 2005). Otra citoquina reportada principalmente ha sido el Factor de Necrosis Tumoral α (FNTa) (Tort *et al.*, 2003; Mulero *et al.*, 2005).

2.6. ENFERMEDADES EN PECES ORNAMENTALES

2.6.1. GENERALIDADES

Los peces de agua dulce en condiciones naturales o de cultivo son susceptibles a agentes virales, bacterianos, micóticos y parasitarios. Cuando se presentan condiciones desfavorables en el medio donde habitan, los peces disminuyen su capacidad de defensa, y los microorganismos infectan al hospedero produciéndose trastornos patológicos (Centeno *et al.*, 2004); que limitan su producción y su expansión (Parker, 2012).

En instalaciones de cultivo se pueden presentar algunas condiciones desfavorables tales como :una disminución en el contenido de oxígeno disuelto en el agua, variaciones de temperatura, hacinamiento por altas densidades o elementos tóxicos en el agua, los que influyen en la respuesta inmunológica del pez y favorecen la invasión, adhesión, colonización y toxicidad de microorganismos (González y Heredia , 1998).

La presentación de la enfermedad en los peces se basa en un complejo formado por el pez, ambiente y patógeno en la cual el estado susceptible del pez, la mala calidad del ambiente y la capacidad del patógeno van a causar su presentación (Francis-Floyd, 2009; Palmeiro, 2010), sin embargo, la enfermedad raras veces va a desarrollar por el simple contacto del patógeno y el hospedero (Parker, 2012).

En la crianza de los peces siempre va a ser difícil controlar las enfermedades puesto que las condiciones del medio acuático no siempre van a ser estrictamente controlados (Southgate, 2000), por lo que es necesario conocer las nociones básicas del manejo del ambiente del pez ya que el tratamiento contra la enfermedad incluirán los peces y el ambiente (Oestmann, 1998).

La alteración de los parámetros físico-químicos del ambiente acuático tales como: cambios bruscos de pH, salinidad, temperatura, factores del ambiente social, manejo físico, transporte, manejo nutricional, medicación y la influencia de los agentes patógenos van a inducir stress en los peces, afectándolos de manera negativa (Auro y Ocampo, 1999; Pasnik *et al*, 2010).

El stress es la condición en la cual el animal es incapaz de mantener su estado fisiológico normal debido a varios factores a los que está expuesto fuera de los límites de su tolerancia, afectando su bienestar (Parker, 2012). Además los peces pueden presentar respuestas variables según la naturaleza y el grado de stress (Pasnik *et al*, 2010).

Dentro de las enfermedades que afectan a los peces están las de origen no infeccioso que incluyen a las enfermedades nutricionales y las producidas por la mala calidad del medio acuático. En el otro grupo de enfermedades se incluyen las enfermedades infecciosas causadas por virus, hongos, bacterias, parásitos y otros los cuales han sido ampliamente estudiados más en los peces destinados al consumo humano (Roberts, 2001).

2.6.2 .ENFERMEDADES DE ORIGEN INFECCIOSO

2.6.2.1. ENFERMEDADES BACTERIANAS

Enfermedad por *Flavobacterium columnare*

Todos los peces son susceptibles a alguna forma de enfermedad causada por el género *Flavobacterium spp*. Estos microorganismos son considerados ubicuos en el medio ambiente acuático, ocasionando enfermedad en peces sometidos a algún tipo de estrés (Shotts y Starliper, 1999).

Características microbiológicas

Esta bacteria está descrita como bacilos gram negativos, finos, aeróbicos, microaerofilicos. Las colonias están usualmente pigmentadas (de color amarillo a naranja), variando en forma plana propagándose a una forma convexa, dependiendo del respectivo medio de crecimiento .Son usualmente positivos a la reacción de oxidasa, fosfatasa y ribonucleasa. No crecen en medios convencionales, hidrolizan la elastina y condroitin sulfato, utiliza glucosa y se adhiere fuertemente al agar (Shotts y Starliper, 1999; Tripathi *et al* .,2003)

Epidemiología

Estos microorganismos son considerados que están presentes en el ambiente acuático y se les encuentra en los aislamientos obtenidos de los brotes de enfermedad ya sea por stress o por algún factor ambiental. La enfermedad no aparece de forma repentina, sino que requiere alguna alteración en la calidad del ambiente y en el mismo pez ya que los peces saludables son resistentes a la enfermedad (Shotts y Starliper, 1999).

Signos clínicos

Los signos clínicos son inespecíficos, presentan letargia, inapetencia, nado cerca a la superficie del agua, movimiento opercular acelerado, a la vez con lesiones combinadas de la piel, branquias, aletas (Tripathi *et al.*, 2003).

Se puede observar un aumento en la cantidad de moco sobre la cabeza y la parte superior del cuerpo, el cual avanza a áreas circulares de crecimiento opaco, teniendo un tono limón amarillo tenue (Shotts y Starliper, 1999).

Lesiones

A nivel de las branquias se puede observar una severa inflamación neutrofílica que avanza a una necrosis branquial. En las infecciones agudas, la hipoxia y la muerte pueden resultar como consecuencia del daño extensivo a las branquias. Sin embargo, las lesiones también pueden localizarse sobre la cabeza y en la parte craneodorsal del cuerpo. Como las lesiones de la piel se propagan de la base de la aleta caudal, una banda pálida blanca se extiende lateralmente y termina rodeando al cuerpo para formar una lesión característica de ensillado. A medida que la lesión progresa, se desarrollan úlceras blanco amarillentas en el centro de esta lesión. En la enfermedad avanzada se desarrollan úlceras extensivas y profundas de la piel exponiendo el músculo subyacente y el hueso. También se observa los focos bacterianos fijados a la piel lo que le da una apariencia externa de lana de algodón. A medida que avanza la enfermedad, se ha observado frecuentemente úlceras hemorrágicas en la boca en la carpa koi (Decostere *et*

al., 1998; Shotts y Starliper, 1999; Tripathi *et al.*,2003)

Enfermedad por *Staphylococcus epidermidis*

Características microbiológicas

Son cocos gram-positivos, inmóviles, fermentativos, oxidasa negativa y catalasa positiva (Su Hsien y Quintanilla ,2008).

Epidemiología

Se han demostrado que los *Staphylococcus sp.* patógenos de peces difieren antigénicamente de las cepas de origen humano, por lo tanto, se considera que el principal reservorio o fuente de infección debe ser el agua o los propios peces(Su Hsien y Quintanilla,2008).

Signos clínicos

Casi no muestran signos clínicos, solamente en algunos peces se manifiesta exoftalmia, ascitis, ulceraciones en la cola y natación girante en fondo o superficie de agua (Su Hsien y Quintanilla, 2008)

Lesiones

Se caracteriza por la presencia de tubérculo blanco y granulomas en todos los órganos internos (Su Hsien y Quintanilla, 2008).

Enfermedad causada por *Pseudomonas sp.*

Características microbiológicas

Son bacilos rectos o curvos, gram negativos, móviles, catalasa positivos y aerobios estrictos (Roberts, 2001)

Epidemiología

Es un género de microorganismo muy habitual en los ambientes acuáticos.

Generalmente han sido considerados patógenos oportunista. Suele presentarse en peces que habitan acuarios con malas condiciones (Padrós y Furones ,2007).

Signos clínicos

Las aletas se pueden mostrar rotas, partidas o simplemente desintegradas (Jiménez, 2007).

Lesiones

Degeneración de las aletas, degeneración branquial, inflamación de la boca y mucus amarillento alrededor de las áreas afectadas. Las aletas del lomo y las codales son las más afectadas (Jiménez, 2007).

Enfermedad causada por *Carnobacterium piscícola* (*Lactobacillus piscícola*)

Características microbiológicas

Producen colonias bien pequeñas redondas y opacas de morfología cocobacilares, gram positivos, catalasa y oxidasa negativos, no móviles y fermentativos (Austin y Austin, 2007).

Epidemiología

Existen pocos informes que citan *Lactobacillus spp.* como patógenos en peces. Sin embargo, no está claro si los peces son los huéspedes naturales de *Carnobacterium* y otros *Lactobacillus*, o si son parte de la microflora natural acuática (Austin y Austin, 2007).

Signos clínicos

Los signos clínicos son inespecíficos, presentan letargia, inapetencia (Austin y Austin, 2007).

Lesiones

En peces muertos y moribundos se encuentran hallazgos, tales como: en los ojos, una intensa hemorragia periocular, en el riñón, un gran número de túbulos renales con degeneración de gota hialina y el epitelio de algunos de estos túbulos era necrótico y vacuolado; intestino, necrosis del epitelio mucoso; hígado, congestión en los sinusoides, líquido en cavidad abdominal; (Austin y Austin, 2007).

Enfermedad causada por *Enterococcus*(*Streptococcus*) *faecalis subs.liquefaciens*

Características microbiológicas

Son cocos, gram positivos, móviles, catalasa y oxidasa negativos (Austin y Austin, 2007).

Epidemiología

Es el género más importante de bacterias ácido lácticas típicas, habitantes naturales del tracto gastrointestinal de los mamíferos. Algunos son patógenos oportunistas y producen enfermedad en animales inmunosuprimidos (Austin y Austin, 2007).

Signos clínicos

Los signos clínicos son inespecíficos, presentan letargia, inapetencia (Austin y Austin, 2007).

Lesiones

Ulceras en aletas dorsales y caudales, líquido en el abdomen (Austin y Austin, 2007).

Enfermedad causada por *Bacillus sp.*

Características microbiológicas

Son bacilos, gram positivos, móviles, catalasa positivos, no móviles y fermentativos (Austin y Austin, 2007).

Epidemiología

La presencia de *Bacillus sp.* es frecuente en una gran variedad de ambientes naturales, como el agua y el suelo (Austin y Austin, 2007).

Signos clínicos

En los peces se observa inapetencia, letargia, emaciación, dermatitis necrotizante generalizada (Austin y Austin, 2007).

Lesiones

En el hígado y riñón se observan petequias y focos de necrosis; en el bazo, suave, agrandado y friable; estómago, hiperémico (Austin y Austin, 2007).

Familia Enterobacteriaceae

Enfermedad por *Edwardsiella tarda*

Características microbiológicas

Es un bacilo gram-negativo, móvil. Es anaerobio facultativo y mesófilo, negativo a la reacción oxidasa, positivo a la reacción de indol y fuerte productor de H₂S. (Plumb, 1999; Mohanty y Sahoo, 2007).

Epidemiología

Edwardsiella tarda es una bacteria que ha sido aislada en la mayoría de los continentes afectando una gran variedad de peces ya sean ornamentales o de consumo bajo condiciones naturales de enfermedad o por experimentación. (Srinivasa Rao *et al.* 2004; Choresca *et al.* 2011).

Este agente es importante desde el punto de vista de la salud pública ya que es conocido que causa enfermedades en reptiles, pájaros, humanos y otros mamíferos (Mohanty y Sahoo, 2007). Es una bacteria oportunista que aparece ante cualquier alteración del ambiente y también por la susceptibilidad del pez por las condiciones estresantes de crianza (Plumb, 1999).

Vandepitte *et al.* (1983) documentaron un caso de Edwardsielosis en un niño de 2.5 años de edad con sintomatología constante de diarrea que solo cedió ante la antibioterapia en cuya casa tenían un acuario con peces de la especie *Pterophilum*

scalare del que se pudo aislar también la misma bacteria, lo que confirma la transmisión zoonótica de la enfermedad.

Signos clínicos

Los peces afectados manifiestan movimientos de espiral errático, están separados de los otros peces, dejan de comer y por lo general son aislados o sacrificados ante la presencia de estos signos para no afectar al resto de peces (Mohanty y Sahoo ,2007).

Lesiones

Al morir el pez se puede observar el opérculo reventado. También se puede ver erosiones o úlceras en la piel, branquias pálidas, tumefacción del ojo y sangrado. Sin embargo, estas lesiones no ayudan mucho al diagnóstico inicial puesto que son similares a las infecciones causadas por otras bacterias y que son conocidas como septicemia bacteriana hemorrágica (Mohanty y Sahoo ,2007).

2.6.2.2. ENFERMEDADES PARASITARIAS

MIXOSPORIDIASIS

Los parásitos responsables de esta enfermedad son los mixosporidios, los cuales son del Phylum Myxozoa, Clase Myxosporea y orden Bivalvulida, son restrictos a invertebrados y vertebrados poiquilotermos, la gran mayoría infecta a los peces (Martins *et al.*, 1999; Noga, 2000; Azevedo y Matos, 2003; Barassa *et al.*, 2003), e incluyen unas cuantas especies que afectan también a anfibios y reptiles (Feist y Longshaw, 2000; Eiras *et al.*, 2005). Pocas especies de mixosporidios causan síntomas graves, sin embargo algunas son severos patógenos de teleósteos, produciendo importantes impactos económicos y ecológicos en poblaciones de peces en Europa y USA (Kallert, 2006). Los géneros *Henneguya* y *Myxobolus* son unos de los más importantes patógenos en peces marinos y de agua dulce (Azevedo y Matos, 2003; Eiras *et al.*, 2005). En Sudamérica, *Henneguya* es la especie más común, con 31 especies (Barassa *et al.*, 2003).

Los Myxosporea usualmente miden 10-25 µm las mixoesporas, y 300 µm las

actinoesporas presentando una gran diversidad en formas y variación morfológica (Kallert, 2006). Una de las más importantes características de los Myxosporea es que, excepto durante la autogamia (reproducción sexual), todos los estadios son formas multinucleadas que tienen células envoltoras (primarias) que contienen células envueltas (secundarias) (Noga, 2000).

El ciclo de vida de los Myxosporea toma lugar en dos hospederos, existiendo dos fases: mixospora y actinospora. En la primera se realiza la multiplicación del parásito, y se desarrolla en vertebrados menores, siendo los peces los más comunes; en la segunda envuelve un proceso sexual, y se desarrolla en invertebrados, principalmente en anélidos (Wolf y Markiw, 1984).

Las actinosporas liberadas de los anélidos, ingresan en el pez por la piel o por el epitelio branquial, las cápsulas polares descargan sus filamentos polares, fijándola al hospedero. Luego las válvulas se abren, y el esporoplasma ingresa a través de aberturas en células epidérmicas y del epitelio. Posteriormente, siguen las fases intracelulares o intercelulares previas a la esporogonia, para migrar luego al lugar de desarrollo de la fase de esporogonia (quiste o plasmodium), el cual contiene núcleos vegetativos, células esporogónicas y pericitos; siendo éstas dos últimas responsables de la esporogonia, dividiéndose y formando las diversas estructuras de la espora madura. El pericito en unión con las células esporogónicas son llamados panesporoblastos. Los estadios plasmodiales pueden ser formas histozoicas (ubicadas en los espacios intercelulares, vasos sanguíneos o intracelularmente) y formas celozoicas (ubicadas en cavidades orgánicas). Las mixoesporas contienen generalmente de una a cuatro cápsulas polares, uno o dos esporoplasmas y un armazón con dos a tres válvulas (Noga, 2000; Dyková y Lom, 2006). Se cree que las mixoesporas son liberadas cuando el pez muere, siendo ingeridas por invertebrados tales como los anélidos. En estos hospederos se realiza la fase sexual, el esporoplasma de la mixospora inicia una merogonia, gametogonia y esporogonia, para finalmente formar las actinoesporas (Kallert, 2006; Dyková y Lom, 2006).

MICROSPORIDIASIS

Los microsporidios, pertenecen a la orden Microsporidia. No son tan comunes como los myxosporidios, pero son responsables de diversas enfermedades serias en peces de cultivo. Son taxonómicamente específica, infectando solo a una especie determinada de pez o un grupo estrechamente relacionado. Sin embargo algunas especies, como por ejemplo, *Pleistophora hyphessobryconis*, *Glugea stephani* pueden infectar a un rango amplio de peces (Noga, 2000).

Todos los microsporidios son parásitos intracelulares, con un ciclo de vida directo. Poseen una espora de pared gruesa que contiene un esporoplasma. Cuando un huésped ingiere la espora, el esporoplasma se descarga a través del canal de un filamento polar tubular que se almacena en espiral dentro de la espora. El esporoplasma luego migra al órgano diana y se inicia una fase proliferativa (merogonia), produciéndose un gran número de células (merontes) por fisión binaria. En las etapas finales de desarrollo, los merontes dan lugar a esporontes, produciendo esporas maduras. Las esporas maduras pueden liberarse de las lesiones de las superficies del cuerpo o después de la muerte del huésped (Noga, 2000).

2.6.3. ENFERMEDADES DE ORIGEN NO INFECCIOSO

2.6.3.1. Por la calidad del agua

Amoníaco

El amoníaco es el producto final del catabolismo proteico de los organismos acuáticos y es un contaminante común en los sistemas acuáticos, llegando a ser tóxico para los peces en su forma no ionizada, especialmente en temperaturas altas y pH altos, teniendo consecuencias negativas para el desarrollo y sobrevivencia de los peces, su efecto negativo de la toxicidad en organismos acuáticos atribuido al amoníaco en su forma no ionizada (NH₃). (Ismiño y Araujo-Lima, 2002).

Oxígeno Disuelto

El contenido del oxígeno disuelto en el agua de los estanques es sin duda alguna el más crítico entre los factores de calidad del agua; ya que si los niveles de concentración de oxígeno son bajos, los peces se ven afectados, no comen e inclusive recuperando el nivel apropiado este comportamiento se prolonga por algún tiempo más, haciendo a los peces susceptibles a las enfermedades afectadas, dando como resultado la disminución o paralización de la tasa de crecimiento (Francis-Floyd, 2003).

pH

No hay un rango definitivo de pH para un óptimo cultivo de peces, pero un pH entre 5 y 9 es no tóxico para la mayoría de peces, valores de pH inferiores a 5, podrían ocasionar retardo en el crecimiento, mortalidad y problemas en la reproducción de los peces; valores de pH alcalino han sido menos estudiados (Witters, 1998).

2.6.3.2. Por Factores Nutricionales

Son de importancia en cultivos piscícolas donde las especies son alimentadas con dietas artificiales, ya que pueden ocasionar un desequilibrio en los nutrientes o poseer factores contaminantes o tóxicos (Corral *et al.*, 2000).

Un exceso de lípidos provoca acumulación de grasa en el hígado, riñón y bazo, tumefacción, degeneración y coloración amarillenta del hígado, anemia, estenosis intestinal y pérdida de peso, mientras que la carencia lipídica causa una detención del crecimiento, necrosis de las aletas, despigmentación y edema cutáneo, degeneración hepática y renal, anemia, alteración en la natación (Corral *et al.*, 2000). Un exceso de proteínas, produce un aumento del gasto energético para la excreción de nitrógeno, lo que conlleva a una merma del crecimiento, mientras que las deficiencias producen una baja en el sistema inmunitario y pérdida del crecimiento. Un exceso de carbohidratos ocasiona un incremento del glucógeno hepático; ocasionando degeneraciones hepática y pancreocítica, infiltración grasa en el riñón, retraso del crecimiento, mientras que la carencia ocasiona reducción del crecimiento (Covey y Roberts, 1981; Corral *et al.*, 2000).

La deficiencia en vitamina C ocasiona retardo del crecimiento, falta de apetito, alteraciones en la columna espinal, anemia y letargia, así como la de ácido fólico ocasiona anemia eritrocítica deficiencia en Vitamina A ocasiona retardo del crecimiento, ceguera, hemorragia en las aletas (Cowey y Roberts , 1981).

2.6.3.3. Neoplasias

Los procesos neoplásicos son de evolución benigna o maligna, siendo menos frecuentes en las condiciones de cultivo que en las poblaciones silvestres, entre las neoplasias benignas se encuentran fibromas, osteomas y lipomas; entre los malignos son más frecuentes los adenocarcinomas y los tumores tiroideos. Las causas de estas afecciones son difíciles de establecer, pudiendo deberse a orígenes genéticos, respuesta a manifestaciones secundarias de enfermedades, factores dietéticos o por manipulación inadecuada (Corral *et al.*, 2000).

2.7. ESTADO SANITARIO DE LOS PECES ORNAMENTALES EN EL PAIS

La mayor producción de los peces ornamentales del país procede de la región amazónica, obtenidos por medio de la extracción manual en el medio natural, a cargo de pequeños pescadores que se dedican a esta actividad; éstos a su vez los venden a intermediarios quienes finalmente los revenden a las empresas exportadoras ubicadas principalmente en la ciudad de Iquitos (Alcántara, 1991; Tello y Cánepa, 1991)

No existe una norma general que asegure la calidad de los mismos y todos los procesos de la cadena productiva se realizan en forma empírica sin tener mucho conocimiento acerca de la manipulación, transporte adecuado de los peces, los procedimientos a realizar una vez que ingresan a los estanques y/o acuarios provisionales antes de viajar, etc. Esta actividad a gran escala siempre va a implicar el transporte de largas distancias de los peces; lo cual es un evento estresante para los mismos y sumado a alguna mala condición o deterioro de su medio ambiente temporal puede desencadenar en mortalidad y pérdida del lote a entregar (Hignette, 2003; Ploeg, 2007).

Los estudios publicados relacionados al tema en el país son escasos y los pocos que están publicados solo reportan la presencia de algunas bacterias como del género

Aeromonas spp, *Pseudomonas spp*, *Plesiomonas spp* entre otras (procedentes de lesiones externas capturados en su medio natural) que por general están asociadas a bacterias cuya presencia es normal en el medio acuático (Tresierra *et al*, 2008), dándose prioridad a otros proyectos de investigación (biología, acuicultura y marketing).

En los países desarrollados existen protocolos preventivos y/o sanitarios referidos exclusivamente a peces ornamentales como potenciales factores de riesgo de dispersión de enfermedades exóticas ya que son países que mayormente importan dichos productos (Humphrey *et al*, 1986; Stephens *et al*, 2010).

El Instituto Tecnológico Pesquero (ITP) a través del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) es la autoridad competente en la materia sanitaria, encargada de velar por la calidad de los productos pesqueros derivados de la pesca, actividades acuícolas y acuicultura. Además, es el organismo encargado de emitir los certificados sanitarios correspondientes para la exportación de los peces ornamentales, previo control e inspección de los mismos sujetándose a la normas internacionales sanitarias. (ITP - SANIPES, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de Estudio

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

El presente estudio se realizó utilizando muestras de neón tetra, provenientes del departamento de Loreto, adquiridos de acopiadores minoristas de peces ornamentales amazónicos.

3.2. Material Experimental

Tamaño muestral: Se seleccionaron 168 peces de la especie neón tetra (*Paracheirodon innesi*) con una longitud de 2.0 cm aprox. Debido al tamaño de los peces y de sus órganos (bazo 0.2 mm de diámetro, riñón 0.3 mm de ancho y 1 cm de largo aproximadamente, siendo este último raspado completamente con el ansa para el estudio microbiológico) se dificultó la toma de muestra no siendo aptos los mismos tejidos para el estudio microbiológico e histopatológico de un mismo individuo, por lo cual se seleccionan 84 peces para realizar el estudio microbiológico y los 84 restantes para el estudio histopatológico.

Se consideraron 84 peces, basándose en el Teorema de Limite Central de Teoría Avanzada de Probabilidades, la cual afirma que la precisión de la muestra mejora al crecer la n (tamaño muestral), y que en el caso de valores grandes viene a ser mayor o igual a 30 (Spiegel,1991).

Materiales

Materiales para la necropsia:

- Tijeras
- Pinzas
- Lupa
- Hojas de bisturíes N° 15
- Mango de Bisturí N°3
- Guantes de látex
- Tapabocas
- Alcohol 70%
- Benzocaína

Materiales para el proceso Histológico:

- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Alcohol etílico
- Xilol
- Parafina
- Micrótopo
- Hematoxilina
- Eosina

Materiales para el proceso Microbiológico

- Guantes de látex
- Tapabocas

Para el aislamiento de bacterias

- Anzas
- Mecheros
- Placas con medios de cultivo (Trypticase Soya Agar (TSA), Agar Citophaga y Middlebrook 7H9)

Para la coloración GRAM

- Lámina portaobjetos
- Anzas
- Piceta
- Cristal violeta
- Lugol
- Decolorante (alcohol al 95% y acetona 5%)
- Fucsina básica

Para la preparación de medio de cultivo y pruebas bioquímicas

- Papel de aluminio
- Espátula
- Probeta
- Agua destilada
- Frascos de vidrio
- Tiras de ph
- Placas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo
- Trypticase Soya Agar (TSA)
- Agar Citophaga
- Agra Middlebrook 7H9

- Prueba de oxidasa
- Prueba de catalasa
- Medio LIA
- Agar citrato de Simmons
- Caldo de nitratos
- Medio TSI
- Medio Rojo de metilo
- Medio base de Hugh y Leifson
- Medio SIM
- Reactivo de KOVACS

Para el mantenimiento y reactivación de aislados

- Agar Luria
- Caldo tripticasa de soya (TSB)
- Caldo Citophaga

Equipos:

- Cámara digital: NIKON COOLPIX S 4100
- Estufa
- Autoclave
- Horno
- Microscopio de luz artificial: NIKON Eclipse E100
- Acuarios

3.3 Metodología

3.3.1. Toma de muestras: Los peces procedentes de Iquitos fueron transportados a la FMV-UNMSM, donde se mantuvieron en acuarios hasta el momento de la necropsia. Teniendo en consideración que los peces no pueden ser puestos directamente al agua nueva de los acuarios que lo reciben, debido a que se les expone a cambios bruscos de su medio acuático (pH, dureza, etc.), fueron mantenidos en los nuevos acuarios con el agua que fueron transportados y los cambios con la nueva agua fue gradual, hasta su acostumbramiento, protocolo que se realiza en todas las especies de peces antes de

ponerlos a nuevos acuarios. En este estudio los peces de la especie neón tetra (*Paracheirodon innesi*) fueron mantenidos durante 72h desde su recepción hasta el momento de realizar la parte experimental. Tomándose 168 peces sin distinguir individuos clínicamente enfermos de individuos sanos y siendo transportados en recipientes con agua del mismo acuario hasta el área designada para la realización de la necropsia.

3.3.2. Necropsia: Antes del sacrificio, los peces fueron puestos en un recipiente con agua conteniendo benzocaína 1g/20L (Ross y Ross, 2008) donde fueron anestesiados con baños de inmersión de 10-15 segundos para evitar el sufrimiento animal de acuerdo al Comité de Ética y Bienestar Animal de la FMV - UNMSM. Se realizó el examen externo para identificar lesiones o parásitos externos y luego se desinfectó la superficie del pez con alcohol al 70%. Posteriormente, se realizó el sacrificio, mediante la técnica de corte medular con hoja de bisturí, entre el cerebro y medula espinal (Roberts y Shepherd, 1980; Rosenthal, 2007) y se procedió a la necropsia según las técnicas de rutina (Reimschuessel *et al.*, 1988) para realizar el estudio microbiológico de 84 peces. El mismo procedimiento se utilizó para el grupo de peces (84) para realizar el estudio histopatológico.

3.3.3. Estudio microbiológico: Se tomaron 84 peces ya sacrificados, y apoyados con el uso de una lupa, se les realizó una pequeña punción en la superficie de los órganos de riñón y bazo utilizando el ansa estéril de punta para el aislamiento de bacterias. Las muestras fueron sembradas por triplicado en medio Trypticase Soya Agar (TSA), Agar Cytophaga y Middlebrook 7H9 y dejados incubar a T: 28°C, por 24hrs (TSA); 96 hrs (Cytophaga), y 2 a 4 semanas (Middlebrook 7H9). Los aislados obtenidos fueron sembrados en agar Luria y conservados en refrigeración (8 °C) hasta la culminación total de la siembra de las muestras de los 84 peces. Pasado el tiempo (2 semanas) se procedió a reactivarlas a través del cultivo en caldo de tripticasa de soya (TSB) a 28°C por 24hrs y en caldo Cytophaga a 28°C por 96 hrs para luego ser sembrarlas en agar TSA y Cytophaga (de acuerdo al medio donde crecieron) incubándose a una temperatura de 28°C por 24hrs(TSA) y 96hrs (Cytophaga) para posteriormente realizar la caracterización cultural de cada colonia además de la coloración Gram (Anexo N°1), y pruebas bioquímicas: oxidasa, catalasa, Medio LIA, Agar Simmons Citrato, Caldo de nitritos, Medio

TSI, Medio Rojo de Metilo, Medio base de Hugh y Leifson y Medio SIM, para detectar indol en este medio se agrega el reactivo de Kovacs. (Anexo N°2).

Todos los medios para las pruebas bioquímicas fueron preparados en el laboratorio. Se realizaron dos lecturas, una a las 24 horas y otra a 48 horas. Posteriormente, se realizaron la interpretación de los resultados obtenidos de cada colonia aislada, de acuerdo a lo descrito por Buller (2004).

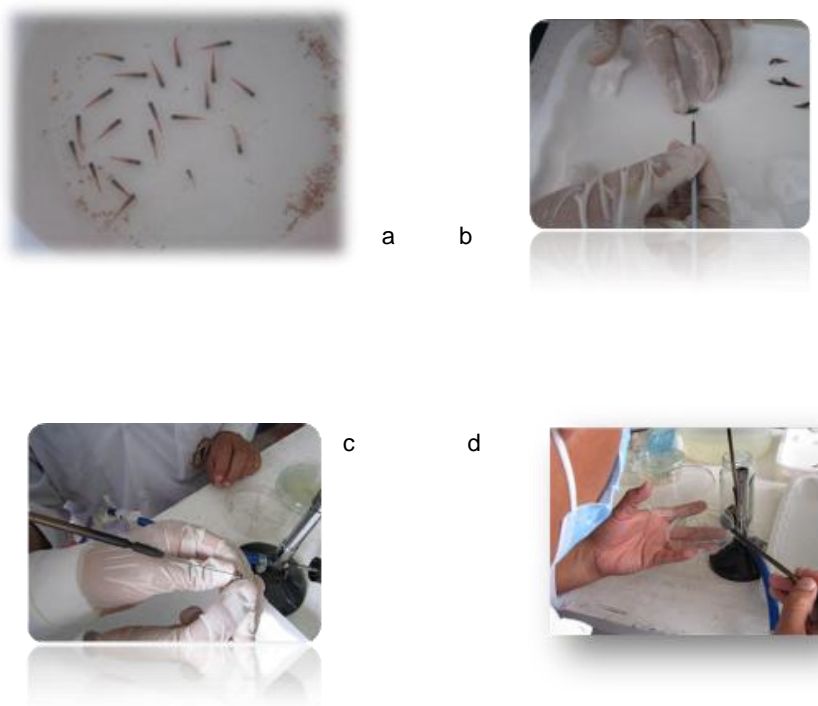


Figura 4. (a) Neón tetra en recipientes antes del sacrificio. (b) Corte medular. (c) Toma de muestras de los órganos riñón y bazo. (d) Sembrado en placas.

3.3.4. Histopatología:

Los 84 peces restantes fueron utilizados para el estudio histopatológico en búsqueda de otros posibles agentes infecciosos y sus lesiones en los tejidos. Los peces ya sacrificados como en el caso anterior, se colocaron en cassetes histológicos y fueron conservados en formol bufferado al 10% hasta su posterior procesamiento (Anexo N°3) y sólo se realizará la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina (H&E). Las láminas obtenidas fueron observadas con un microscopio óptico de luz con aumentos de 10X, 40X, 100X para la determinación de lesiones e interpretadas en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la FMV – UNMSM.

En este estudio se realizó ensayos previos para determinar el mejor corte histológico sagital que nos permitiera observar los órganos internos, debido al tamaño 2 cm aprox. del Neón tetra (*Paracheirodon innesi*).



Figura 5. (a) y (b) Colocación de los peces en los cassetes histológicos. (c) Conservación en formol bufferado al 10%.

3.3.5. Análisis de datos

Las lesiones histopatológicas observadas fueron clasificadas para cada órgano en trastornos inflamatorios, circulatorios, del crecimiento, degenerativos y parasitarios, propuestos por Reimschuessel *et al.* 1992. Estas lesiones fueron clasificadas de acuerdo al grado de afección por su extensión; según los parámetros tomados en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación de la lesión según el grado de afección por su extensión

Grado	Extensión de la lesión
I	Escasa presencia de lesión, hasta 25% aproximadamente de toda la muestra.
II	Leve presencia de lesión, por encima de 25% hasta 50% aproximadamente de toda la muestra.
III	Moderada presencia de lesión, por encima de 50% hasta 75% aproximadamente de toda la muestra.
IV	Severa presencia de lesión, por encima de 75% hasta 100% aproximadamente de toda la muestra.
I: Escaso; II: Leve; III: Moderado; IV: Severo	

Fuente: Reimschuessel *et al.*, 1992.

Para el caso de hígado se utilizará este cuadro para categorizar la degeneración grasa. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Clasificación de la Degeneración Grasa de acuerdo a severidad y extensión de la lesión.

Grado	Severidad	Extensión
I	Escasa presencia de microvacuolas intracitoplasmáticas.	Multifocal, hasta 25% aproximadamente de toda la muestra.
II	Leve presencia de micro y/o macrovacuolas intracitoplasmáticas.	Multifocal, por encima de 25% hasta aproximadamente 50% de toda la muestra.
III	Moderada presencia de macro y microvacuolas intracitoplasmáticas.	Difuso, por encima de 50% hasta aproximadamente 75% de toda la muestra.
IV	Severa presencia de macrovacuolas intracitoplasmáticas.	Difuso, por encima de 75% hasta aproximadamente 100% de toda la muestra
I: Escaso; II: Leve; III: Moderado; IV: Severo		

Fuente: Reimschuessel *et al.*, 1992 modificado por Rosenthal, 2007.

Para el análisis estadístico de los resultados tanto para el estudio microbiológico y el histopatológico, se utilizó un análisis de frecuencia, indicando el porcentaje de cada variable con respecto al total de población analizada para cada análisis.

La frecuencia (F) fue determinada mediante la fórmula:

$$F = \frac{\text{N}^\circ \text{ de animales con X}}{\text{N}^\circ \text{ total de muestras}} \times 100$$

Donde (X) representa: Género bacteriano aislado, lesiones microscópicas determinadas por histopatología.

Los resultados microscópicos de las lesiones según el grado de afección por su extensión en los tejidos, se presentaron en una escala de grados que va de 1-4 descrita anteriormente, con la finalidad de hacer una evaluación más objetiva.

IV.RESULTADOS

4.1. Microbiológicos

A partir de las muestras de riñón y bazo analizados se obtuvieron un total de 39 aislados que crecieron en el Agar TSA y Agar Cytophaga a una temperatura de 28°C. por 24hrs (TSA); 96 hrs (Cytophaga). Hasta las 4 semanas de observación, no se obtuvieron aislados de *Mycobacterium sp.* en el agar Middlebrook 7H9.

Se identificaron 6 géneros bacterianos: *Flavobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.* y 1 familia *Enterobacteriaceae* a partir de los aislados obtenidos indistintamente de los órganos de riñón y bazo en el pez ornamental Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Géneros y Familia bacterianos aislados de riñón y bazo en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú

Bacterias aisladas	N° aislados	%
<i>Flavobacterium sp</i>	8	20.6
<i>Staphylococcus sp.</i>	7	17.9
<i>Carnobacterium sp.</i>	7	17.9
<i>Pseudomonas sp.</i>	6	15.4
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	5	12.8
<i>Enterococcus sp</i>	4	10.3
<i>Bacillus sp.</i>	2	5.1
TOTAL	39	100

4.2. Histología

Dentro de las alteraciones histológicas en las branquias (Cuadro 6), se observó la hiperplasia del epitelio de revestimiento de las lamelas en un 100% (84/84) y fusión de lamelas en un 100%(84/84), (Figura 7 y Figura 8) de manera leve a moderada. Además se observaron hallazgos parasitarios, como esporas de mixosporidios predominantemente en los ápices de las lamelas, con esporas individuales cada una con cuatro cápsulas polares (Figura 6).

Cuadro 6. Frecuencia de alteraciones histológicas de las branquias según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú

TIPO DE TRANSTORNO / LESIONES	GRADO DE AFECCIÓN					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
DEL CRECIMIENTO							
Hiperplasia del epitelio lamelar	0	0	48	36	0	84/84	100
Fusión lamelas	0	0	18	65	1	84/84	100
PARASITARIOS							
Esporas de Mixosporidios <i>sp.</i>	0	0	39	45	0	84/84	100

A pesar de haber encontrado una leve a moderada hiperplasia del epitelio lamelar y una leve a moderada fusión de lamelas, los peces no presentaron alteraciones externas en las branquias ni signos clínicos aparentes de hipoxia (boqueo). Esto puede ser explicado debido a que, las lesiones se presentaron en forma leve y moderada siendo no suficientes para dar como consecuencias signos clínicos evidentes.

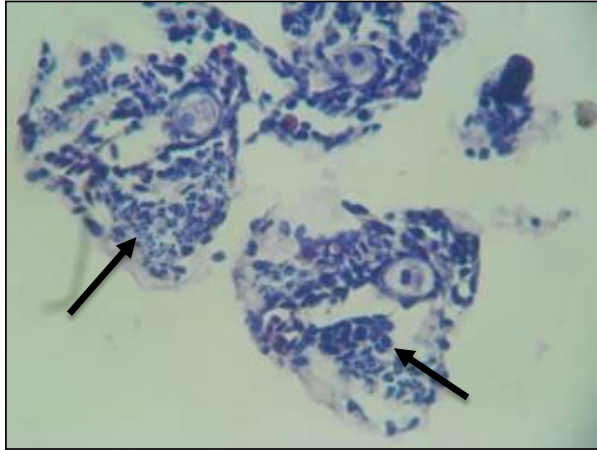


Figura 6: Branquias

Se observan en el ápice de las lamelas esporas de *Mixosporidium sp.* (Flechas) .H &E 100X

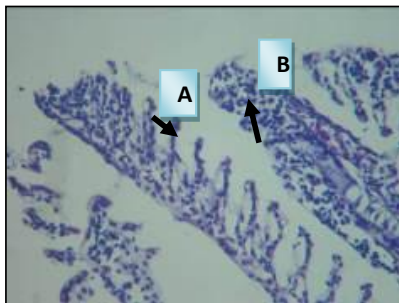


Figura 7: Branquias

Hiperplasia epitelial (Flecha A) y fusión de lamelas (Flecha B) H &E 40X



Figura 8: Branquias

Hiperplasia epitelial y fusión de filamentos branquiales (Flecha). H &E 40X

Dentro de las alteraciones histológicas en el intestino (Cuadro 7), se evidenciaron trastornos de crecimiento caracterizados por una leve a moderada hiperplasia del epitelio en un 100% (84/84) (Figura 9).

Así mismo, se evidenció alteraciones parasitarias por una leve a moderada presencia de esporas de *Microsporidium sp.* en un 100% (84/84) (Figura 10), ubicadas en las vellosidades intestinales.

Cuadro 7. Frecuencia de alteraciones histológicas del Intestino según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú

TIPO DE TRANSTORNO/ LESIONES	GRADO DE AFECCIÓN					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
DEL CRECIMIENTO							
Hiperplasia del epitelio	0	0	74	10	0	84/84	100
PARASITARIOS							
Esporas de Microsporidios	0	3	47	34	0	84/84	100

A pesar de haber encontrado una leve a moderada hiperplasia del epitelio asociada a la presencia de parásitos (*Microsporidium sp.*) los peces no presentaron signos clínicos aparentes.

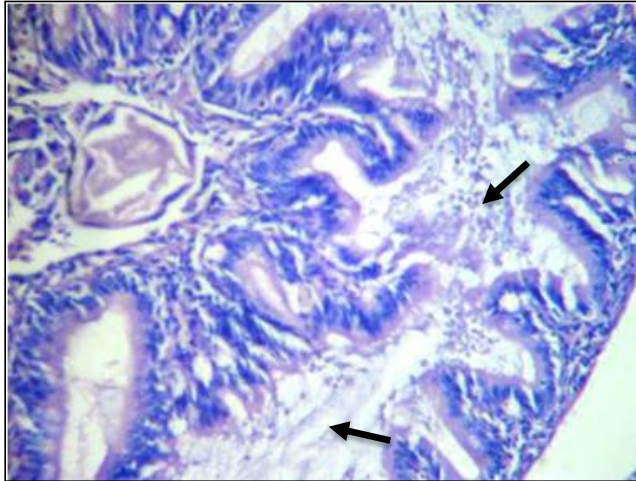


Figura 9: Intestino

Hiperplasia e incremento del mucus en la luz (Flechas) H&E. 100X



Figura 10: Intestino

Se observa presencia de esporas de *Microsporidium* sp en las vellosidades intestinales (Flechas). H&E. 100X

Dentro de las alteraciones histológicas en el hígado (Cuadro 8), los trastornos degenerativos más frecuentes fueron degeneración hidrópica en un 11.9%(10/84), predominando la forma escasa y una severa degeneración grasa en un 36.9 %(31/84), (Figura 11).

Así mismo, se evidencio la presencia de un granuloma parasitario, ubicado en el parénquima hepático en un solo pez (Figura 12).

Cuadro 8. Frecuencia de alteraciones histológicas del hígado según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú

TIPO DE TRASTORNO/ LESIONES	GRADO DE AFECCIÓN					ALTERACIÓN %	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo		Total
DEGENERATIVOS							
Degeneración hidrópica	74	7	2	1	0	10/84	11.9
Degeneración grasa	53	0	0	1	30	31/84	36.9
INFLAMATORIOS							
Granulomas parasitarios		1				1/84	1.2

A pesar de haber encontrado una severa degeneración grasa, los peces no presentaron signos clínicos aparentes.

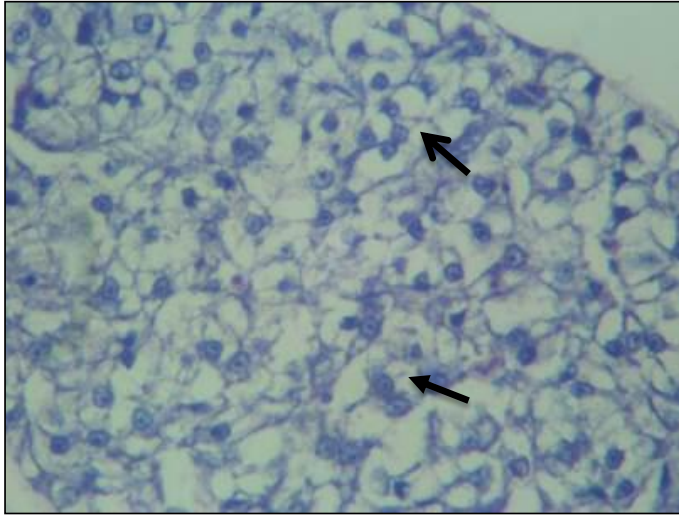


Figura 11: Hígado

Se observan los hepatocitos hinchados con uni-multivacuolas intracitoplasmáticas desplazando al núcleo a la periferie (Flechas). Degeneración grasa Grado 4. H&E 40X

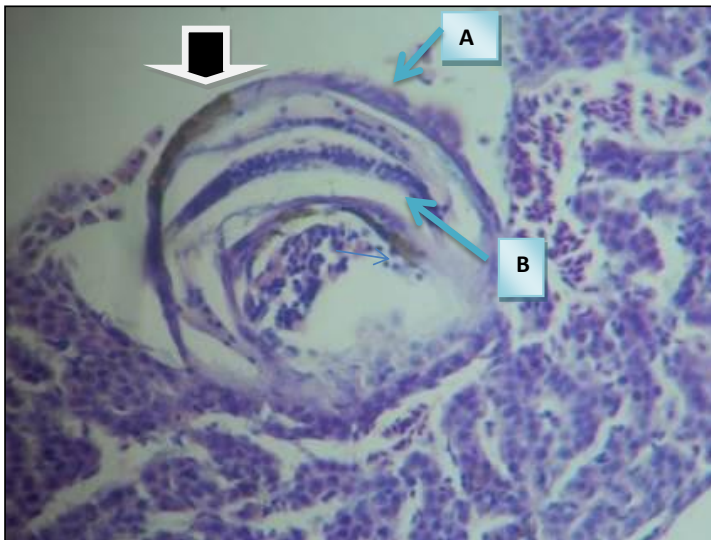


Figura 12: Hígado

Granuloma parasitario (Flecha negra).

Se observa externamente fibroblastos con melanomacrófagos (Flecha A) que rodean al parásito que se encuentra internamente (Flecha B). H&E 100X

Dentro de las alteraciones histológicas renales (Cuadro 9), los trastornos degenerativos más frecuentes fueron un leve a moderado edema peritubular y degeneración hidrópica tubular 100%(84/84) (Figura 13 y Figura 14).

Cuadro 9: Frecuencia de alteraciones histológicas del Riñón según tipo de trastorno y su grado de afección en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú

TIPO DE TRANSTORNO/ LESIONES	GRADO DE AFECCIÓN					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
DEGENERATIVOS							
Edema peritubular	0	0	71	13	0	84/84	100
Degeneración hidrópica	0	0	78	6	0	84/84	100

A pesar de haber encontrado una leve a moderada edema peritubular y degeneración hidropica, los peces no presentaron signos clínicos aparentes.

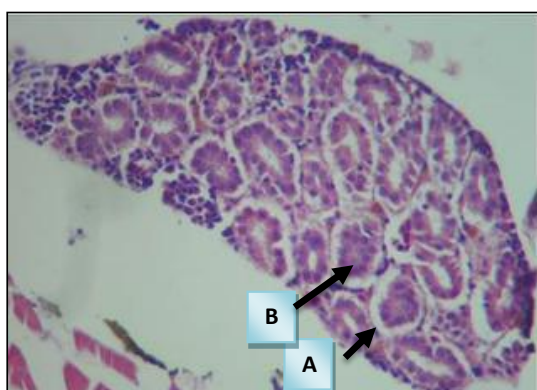


Figura 13: Riñón

Edema peritubular (Flecha A) y degeneración hidrópica (Flecha B). H&E. 100X

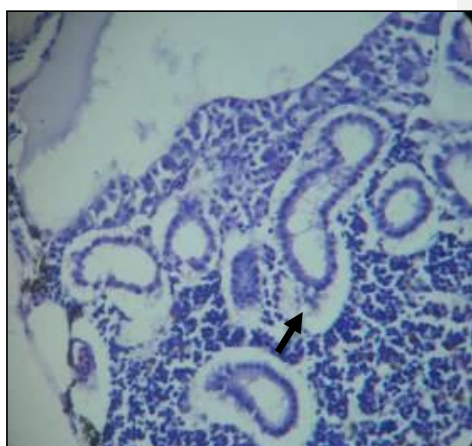


Figura 14: Riñón

Edema peritubular (Flecha). H&E. 100X

Dentro de las alteraciones histológicas en músculo esquelético (Cuadro 10) se observaron trastornos degenerativos como una leve a moderada necrosis muscular 100% (84/84) (Figuras 16 y 17).

Así mismo, se observaron hallazgos parasitarios como una leve a moderada presencia de esporas de *Microsporidium sp.* 100%(84/84) (Figura 15), quistes de *Mixosporidium sp.* (1.2%) (1/84) con estadios esporogónicos inmaduros, sin embargo no presentan reacción inflamatoria en la periferie del quiste ni necrosis muscular en el tejido afectado (Figura 18); esporas de *Pleistophora sp.* (1.2%)(1/84)(Figura 19) caracterizadas por ser redondas de similar tamaño, cuyo interior está conformado por otras estructuras redondeadas de menor tamaño distribuidas en toda la espora, las cuales con la tinción H&E se tiñen algunas de color ácido-filo (en su mayoría) y otros de color basófilo ;estas esporas están rodeadas por una membrana discontinua observándose células inflamatorias alrededor de la misma; *Heterosporis sp.* (1.2%) (1/84)(Figura 20), caracterizada por ser morfológicamente bastante pequeñas, redondeadas, con la tinción de H&E se observa en algunas esporas un borde basófilo en la periferia de la membrana .Estas esporas están delimitadas por una membrana continua, integra, conformando un quiste. Estos hallazgos parasitarios se observaron en individuos diferentes.

Se observaron alteraciones inflamatorias como un granuloma de tipo parasitario (2.4%) (2/84)(Figura 21-22) en individuos diferentes. Además, se observaron múltiples granulomas de diversos tamaños cercanos a diferentes órganos como: hígado , intestino y gónadas , caracterizados por encontrarse en diferentes fases, algunos en una fase inicial con formación nodular ,constituidas por macrófagos con citoplasma espumoso, un ligero centro necrótico y una leve presencia de fibroblastos rodeándolos (Figura 23 A) , otros granulomas se caracterizaban por tener un centro necrótico grande intensamente acidófilo siendo rodeados por varias capas laminares de fibroblastos evidenciándose el reemplazo de los macrófagos por estas fibras (Figura 23 B).Estos granulomas son característicos en algunos procesos infecciosos de tipo bacteriano ,habiéndose encontrado 1.2% (1/84).

Cuadro 10: Frecuencia de alteraciones histológicas del músculo esquelético según tipo de trastorno en el Neón tetra (*Paracheirodon innesi*) procedente de Iquitos-Perú

TIPO DE TRASTORNO/ LESIONES	GRADO DE AFECCIÓN					ALTERACIÓN	
	Normal	Escaso	Leve	Moderado	Severo	Total	%
DEGENERATIVOS							
Necrosis muscular	0	0	54	27	3	84/84	100
PARÁSITOS							
Esporas de							
<i>Microsporidium sp.</i>	0	0	47	37	0	84/84	100
Quistes de							
<i>Mixosporidium sp.</i>	0	1	0	0	0	1/84	1.2
<i>Pleistophora sp.</i>		1				1/84	1.2
<i>Heterosporis sp.</i>		1				1/84	1.2
TRASTORNOS INFLAMATORIOS							
Granulomas parasitarias		2				2/84	2.4
Granulomas bacterianas		1				1/84	1.2

A pesar de haber encontrado una leve a moderada presencia de parásitos, los peces no presentaron alteraciones externas en el músculo ni presentaron signos clínicos aparentes.

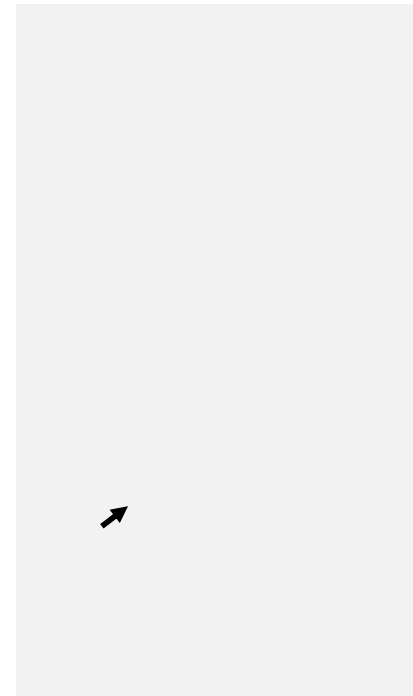
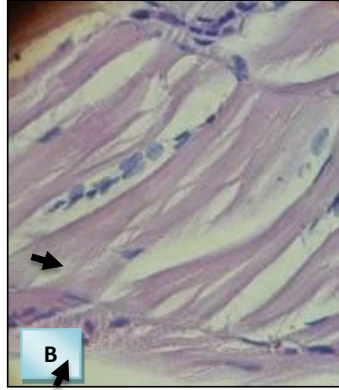
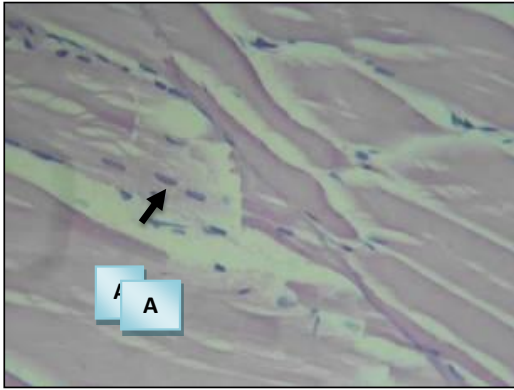


Figura 15: Músculo esquelético

Presencia de esporas de *Microsporidium sp.* (Flechas A)
Necrosis (Flechas B) H &E 100X



Figura 16: Músculo esquelético

Necrosis (Flecha) H&E 100X

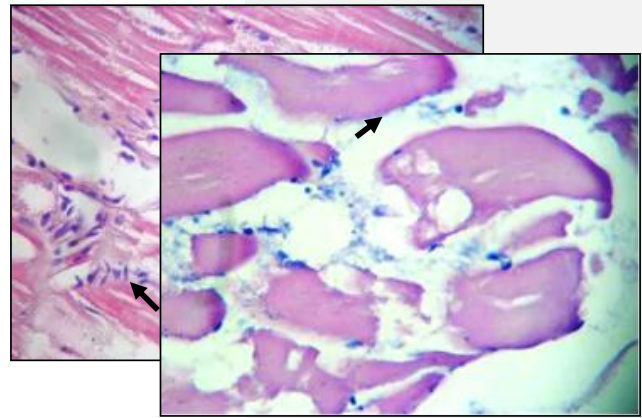


Figura 17: Músculo esquelético

Necrosis y presencia de esporas de *Microsporidium sp.* (Flechas).H &E

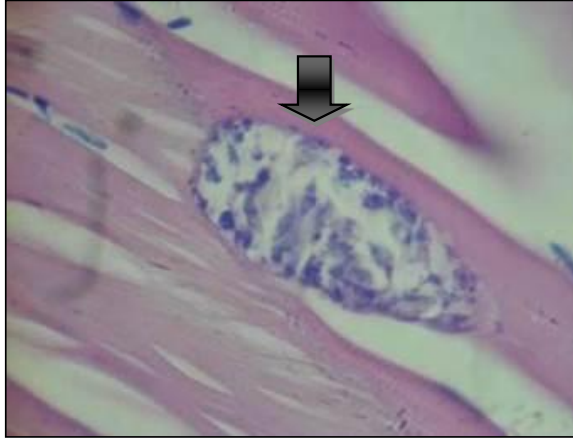


Figura 18: Músculo esquelético

Quiste de *Mixosporidium* sp. (Flecha). H &E 100X.

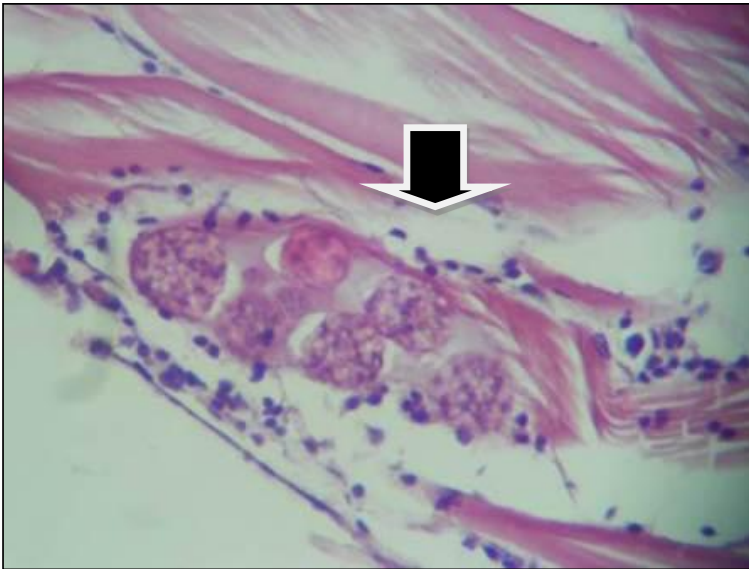
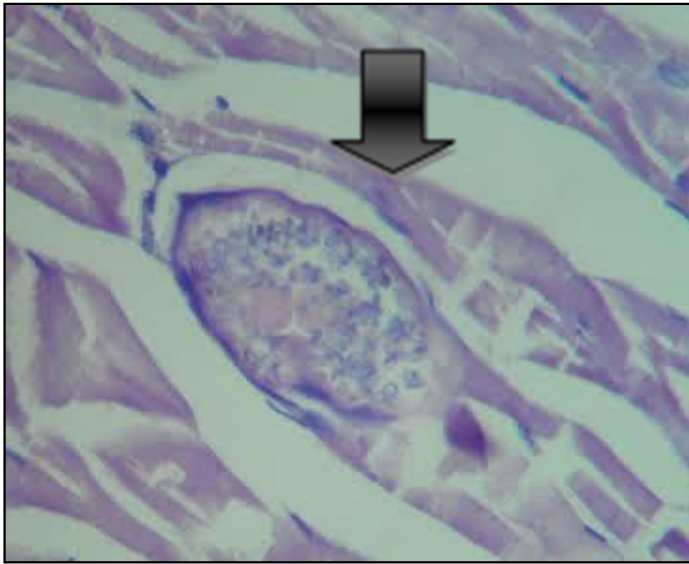
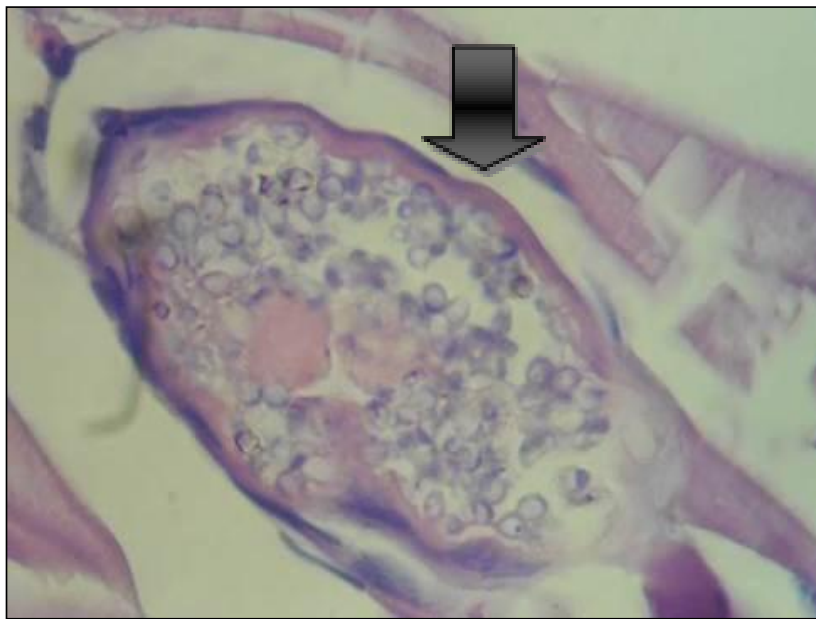


Figura 19: Músculo esquelético

Esporas de *Pleistophora* sp. (Flecha). H &E 100X.



A



B

Figura 20: Músculo esquelé
Heterosporis sp.



Figura 21: Músculo esquelético

Granuloma parasitario (Flecha negra). Externamente se observa fibroblastos y escasos melanomacrófagos (Flecha A) rodeando a una cercarí (Flecha B). H & E 100X.

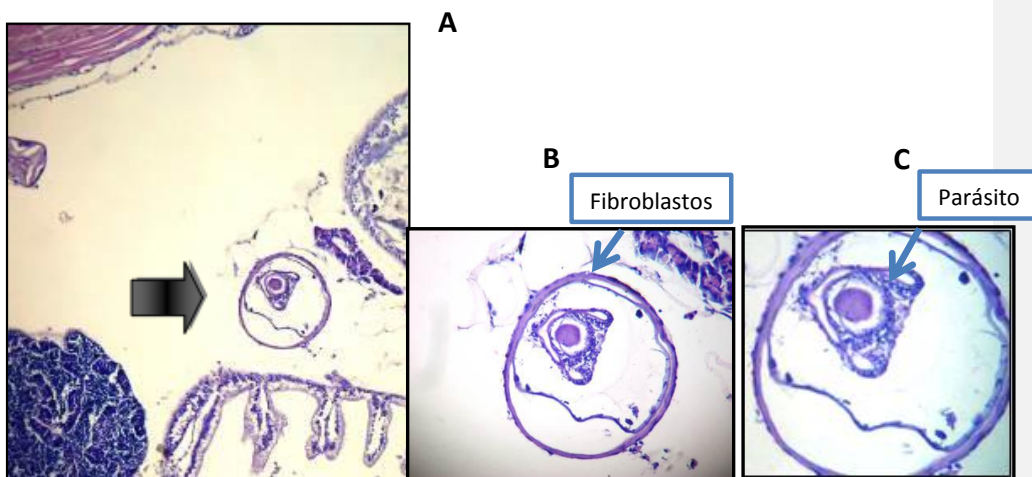
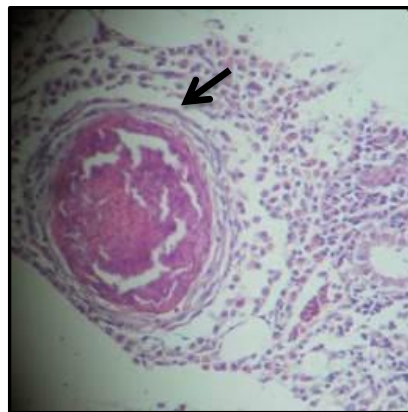
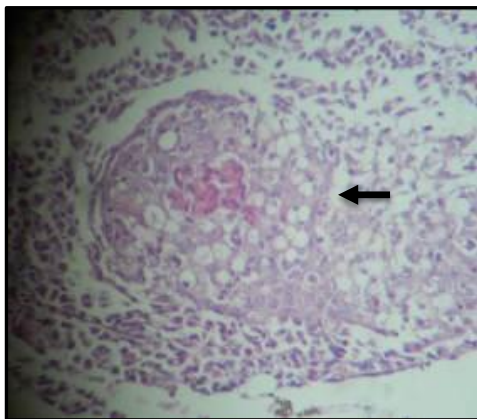
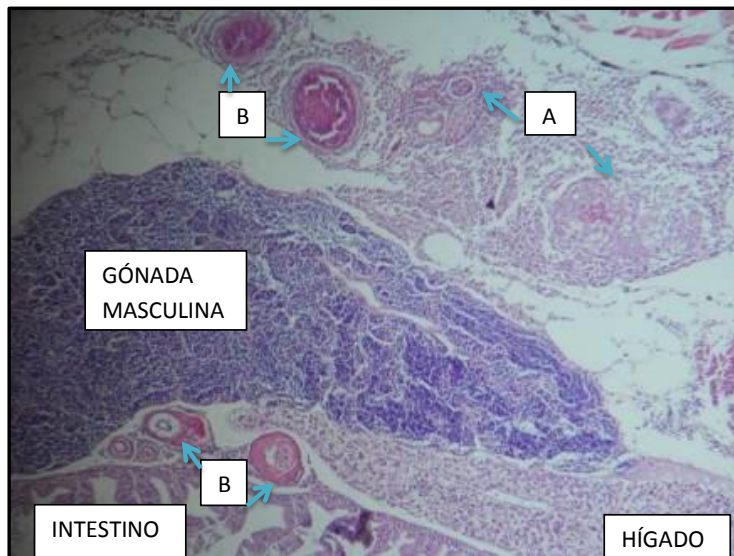


Figura 22

Granuloma parasitaria (Flecha negra)

Obsérvese la distribución de fibroblastos que han reemplazado a los macrófagos (B) alrededor de un parásito (C). H & E (A) 10X (B) 40X (C) 100X.



A: Fase inicial con formación nodular, constituidas por macrófagos con citoplasma espumoso, un ligero centro necrótico y una leve presencia de fibroblastos rodeándolo (Flecha). H&E 100X

B: Se observa un centro necrótico grande intensamente acidófilo siendo rodeados por varias capas laminares de fibroblastos (Flecha). H&E 100X

Figura 23:

Granulomas bacterianas (Flechas azules)

H & E 10X.

V. DISCUSIÓN

Estudios relacionados a las alteraciones histopatológicas y al estudio microbiológico en los peces ornamentales amazónicos neón tetra (*Paracheirodon innesi*), no han sido descritas hasta el momento en el país. Sin embargo, existe escasa bibliografía que evidencia que esta especie es susceptible a diferentes agentes infecciosos, siendo las más comunes los parásitos.

En este estudio, las lesiones halladas en las branquias fueron una leve a moderada hiperplasia del epitelio del revestimiento lamelar 100% (84/84), así como fusión lamelar 100% (84/84).

Noga (2000), afirma que la hiperplasia e hipertrofia epitelial son las más comunes respuestas ante el daño branquial, los que pueden llevar como consecuencia a fusión de las lamelas y filamentos; sostiene que las lesiones en branquias tienen un alto grado de inespecificidad, y pueden ser originadas por diferentes causas tales como bacterias, parásitos o una pobre calidad del agua.

En el presente estudio, las lesiones en las branquias podrían ser explicadas debido al efecto de causas infecciosas de tipo parasitario como *Mixosporidium sp.* ya que, estuvieron presentes en el 100% de los peces, de manera leve a moderada; y a causas no infecciosas relacionadas a una mala calidad del agua, debido a que los peces provienen de la captura en ríos y las fuentes de agua del Amazonas contiene generalmente altas cargas de materia orgánica y desechos tóxicos. Esto puede sustentarse con lo observado también por Verján (2002), en un estudio

histopatológico en peces amazónicos clínicamente sanos, quien determinó frecuentemente alteraciones branquiales como pérdida de láminas, hiperplasia del epitelio, infiltración de células inflamatorias en el arco y en el filamento; afirmando que estas lesiones branquiales estarían directamente relacionadas con una mala calidad del agua pero también habría una relación entre los factores químicos del agua y la presencia de algunos parásitos.

Factores nutricionales como dietas con una deficiencia de vitamina C o ácido pantoténico también pueden originar lesiones branquiales. La importancia de la vitamina C esta también relacionada con la maduración del cartílago y del colágeno, por lo tanto, ante la deficiencia habrá un desarrollo anormal del cartílago, evidenciando distrofia del cartílago y alteración de las branquias (Cowey y Roberts, 1981). Sin embargo, no se observaron ninguna de las lesiones mencionadas en los casos estudiados, por lo cual si se puede afirmar que la causa de las lesiones en las branquias no está asociada a deficiencia de vitamina C o ácido pantoténico.

Los animales muestreados no presentaron alteraciones externas en las branquias ni previamente presentaban signos clínicos aparentes de hipoxia (boqueo), a pesar de las lesiones histológicas anteriormente encontradas tales como hiperplasia del epitelio branquial, fusión de lamelas y presencia de esporas de mixosporidios, que fueron en el 100% de los peces examinados. Esto puede ser explicado debido a que, las lesiones se presentaron en forma leve y moderada; no suficiente para dar como consecuencia signos clínicos evidentes. Como lo sostiene Verján (2002), quien explica que peces amazónicos toleran cierto número de parásitos sin manifestar signos clínicos evidentes e incide en que la infección o infestación, así como patologías no equivalen a enfermedad clínica.

Sin embargo, cabe mencionar que los *Microsporidium* observados son potenciales agentes infecciosos que ante situaciones de stress para el pez, condiciones adecuadas para su desarrollo, estos pueden proliferar de manera exponencial; produciendo como consecuencia lesiones de moderadas a severas que pueden inducir a signos clínicos evidentes , alteraciones de los tejidos y la salud.

En el intestino, se evidencio una leve a moderada hiperplasia del epitelio 100%(84/84); estas lesiones pueden ser producidas por un período de ayuno prolongado, situación de estrés (a la captura, traslado), generándose cambios en la permeabilidad intestinal, este cambio causa un daño a la mucosa intestinal (Farhadi *et al.*, 2003; Lambert, 2003). Así mismo la hiperplasia de los enterocitos y células mucosas pueden ser consecuencia de la presencia constante de parásitos en la mucosa (Jubb *et al* 2007). En este estudio, la hiperplasia de los enterocitos podría ser explicado debido a que los peces tuvieron un ayuno prolongado, desde su transporte (Iquitos-Lima),y su posterior recepción, hasta el período de hacer el experimento, aproximadamente 72 horas. Sin embargo, se considera en este caso la mayor influencia para la hiperplasia de los enterocitos y células mucosas a la presencia de los parásitos, ya que en el 100% (84/84) de los peces se evidenció parásitos de tipo *Microsporidium sp*, enquistados en los enterocitos, induciendo además acortamiento y pérdida de la vellosidades.

En el riñón se encontraron trastornos degenerativos como la degeneración hídrica 100%(84/84) y edema peri tubular 100%(84/84). Hibiya *et al.* (1982) menciona que la degeneración hídrica antecede a la presentación de la degeneración hialina y la excesiva acumulación hialina podría conllevar a la necrosis del epitelio, evidenciándose por la vacuolización del citoplasma y la picnosis.

Han sido publicado muchos informes sobre los cambios patológicos en los túbulos renales de los peces, donde se mencionan que algunas bacterias y parásitos pueden tener un efecto patológico directo en el túbulo renal, así mismo, la exposición a metales pesados o productos químicos agrícolas también pueden afectar indirectamente el túbulo mediante la promoción de anomalías metabólicas. La mayoría de las alteraciones tubulares renales se encuentran en las células epiteliales. La hinchazón de las células epiteliales del túbulo renal se conoce como degeneración albuminosa que se cree que es un cambio reversible promovida por una sobrecarga en el funcionamiento de la célula u órgano. Este cambio se observa a menudo en el epitelio del segmento del túbulo contorneado proximal. Las células afectadas se someten a la hipertrofia y el citoplasma exhibe gránulos diminutos; los contornos celulares no pueden distinguirse claramente, y el calibre luminal de los túbulos disminuye (Hibiya *et al.*1982).

Ferguson (2006), menciona que la necrosis inducida por el hexaclorobutadieno (HCBD) en goldfish, provoca degeneración hídrica (principalmente en el segmento 2 ,3

del túbulo proximal) haciendo que se vea claramente la hinchazón celular en las tinciones de H & E. Sin embargo, dado a que la morfología de los segmentos del túbulo lesionado cambia drásticamente, es difícil identificar qué segmento se lesiona, usando sólo tinción H & E. Las tinciones con enzimas histoquímicas, tales como, gamma glutamitranspeptidasa pueden ayudar a identificar qué parte de las nefronas está involucrado. Las vacuolas son el resultado de hinchamiento mitocondrial, y como falla la función mitocondrial, la célula pierde su capacidad de osmoregulación y se hincha (Ferguson, 2006). Cuando esta alteración es irreversible, suele conducir a la muerte celular observándose edema intracelular, que corresponde al aumento de agua y sodio en el citoplasma o en las cisternas de retículo endoplásmico, este fenómeno se debe a la alteración de la Bomba Na, K y ATP así producido por la disminución de ATP (Cotran *et al*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2004; De Castro y Pérez, 2007).

En el presente estudio, las lesiones encontradas en el riñón, podrían ser explicadas debido al efecto de causas no infecciosas relacionadas a una mala calidad del agua, debido a que los peces provienen de la captura en ríos y las fuentes de agua del Amazonas que contiene generalmente altas cargas de materia orgánica y desechos tóxicos.

Del total de las alteraciones histológicas observadas en el hígado de los neones tetra, se encontró una escasa degeneración hidrópica en un 11.9% (10/84) y una severa degeneración grasa 36.9%(31/84), sin manifestar los peces signos clínicos. López *et al.* (2001) reportaron una mayor cantidad de cambios degenerativos en el hígado de salmonídeos (81.8%), siendo la degeneración grasa y vacuolar las más observadas, lo que indica que estos procesos son importantes en peces debido a que pueden ser ocasionados por una amplia variedad de factores etiológicos (fallas circulatorias, dietas mal balanceadas, carencias nutricionales y procesos tóxicos, entre otros).

Tacon (1992) y Ferguson (2006) describen como una de las principales causas de degeneración hidrópica y grasa, los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas, lo que lleva a cambios oxidativos en los lípidos (rancidez) si están almacenadas en altas temperaturas y expuestas al oxígeno atmosférico, o en ausencia de un adecuado antioxidante como la vitamina E. Estos ácidos grasos reaccionan con las proteínas, lípidos y vitaminas de la dieta bajando su valor biológico.

Kalogeropoulos *et al.* (1992), señalan que otra causa de cambios degenerativos puede ser por un exceso de lípidos en la dieta, que puede ocurrir cuando la cantidad de lípidos ingerida excede la capacidad de almacenamiento del órgano; así mismo Wolf y Wolfe (2005), sostienen que una acumulación de lípidos en los hepatocitos de peces podría ser resultado de una sobrealimentación y una dieta excesivamente rica en energía. Similarmente, Reyna en 1993, señala problemas nutricionales como dietas ricas en grasa, movilización de grasa en estados de caquexia donde la grasa se acumula en el hepatocito, dietas pobres en proteínas, estados de hipoxia y anoxia, e intoxicaciones entre las causas que originan un cambio de grasa.

Vigliano *et al.* (2002) menciona que también contribuye a la degeneración grasa, los ayunos prolongados, lo cual caracteriza en fases tempranas por una movilización rápida de las reservas, si son periodos largos de ayuno se asocia a un pronunciado catabolismo de lípidos y proteínas, produciendo la pérdida de peso. Asimismo, Guillaume *et al.* (2004) menciona que durante el ayuno hay un aumento de la actividad gluconeogénica en hígado utilizando los aminoácidos como sustrato para la síntesis de glucosa y ésta puede ser transformada en grasa.

La deficiencia de colina puede también ocasionar degeneración grasa ya que es un factor lipotrópico, indispensable en el transporte de grasas, siendo necesaria en la dieta de los peces (Cowey y Roberts, 1981). En algunas especies de peces, el hígado es el órgano principal de almacenamiento de las grasas, evidenciando histológicamente gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos, incluso trastornos grasos que comprometen amplias áreas del parénquima no son considerados patológicos (Cowey y Roberts, 1981).

Wolf y Wolfe (2005), sostienen que debido a que varios peces silvestres y en cautiverio sanos tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de lípidos, es difícil distinguir que clase de vacuolas lipídicas son consideradas excesivas, por lo que no hay un adecuado criterio para el diagnóstico de lipidosis hepática.

Mediante este estudio se puede sugerir que el hígado del Neón tetra no es el órgano principal de almacenamiento de las grasas, debido a que sólo 31/84 (36.9 %) evidenciaron hígado graso y el resto 53/84 (63.1%) tenían una citoarquitectura sin cambios celulares aparentes. Así como, el caso de la degeneración hidrópica que sólo

10/84 (11.9%) fueron afectados por esta lesión y 74/84 (88.1%) neones tetras fueron aparentemente normales. Esto permite sugerir que las lesiones son producidas por un inadecuado manejo en la alimentación, con un mayor consumo de energía que proteína por lo cual ingresa más ácidos grasos de los que salen del hígado; una deficiencia de colina en la dieta, que generaría inadecuado transporte de los ácidos grasos, trayendo como consecuencia almacenamiento en el hígado de grasa; y, periodos prolongado de ayuno. Siendo este último el más indicado para este estudio.

Por otro lado, el 100% (84/84) de los peces presentaban distintos parásitos, predominando los *Microsporidium*; se observaron esporas de *Microsporidium sp.*, 100 % (84/84) quiste de *Mixosporidio sp.*, 1.2%(1/84), esporas de *Pleistophora sp.* y *Heterosporis sp.* 1.2%(1/84) respectivamente, en el músculo esquelético con estadios esporogónicos inmaduros, no habiendo una reacción inflamatoria en la periferia ni daños en el tejido, coincidiendo con Ferguson (2006), que sostiene que la mayoría de los microsporidios con estadios inmaduros parecen producir una leve o nula respuesta inflamatoria y generalmente, son encontrados como hallazgos incidentales en el trabajo de rutina diagnóstica.

La presencia de microsporidios, aún en forma escasa o leve, como de otros patógenos podría deberse a las condiciones del medio ambiente, manejo, grado de infestación o inmunidad del hospedero (González y Heredia, 1998). Sin embargo, Ferguson (2006), afirma también que infecciones de músculo con *Microsporidium* y *Myxozoas* son responsables de muchas enfermedades significativamente económicas, debido a que, estos parásitos producen lesiones macroscópicas extensas y visibles que reducen el valor de los peces.

Lesiones tales, como necrosis muscular 98.8% (83/84) halladas en el músculo esquelético de los peces que no presentaban quistes parasitarios, se manifestaron en forma leve y moderada, aunque pueden sugerir probablemente una relación de estas lesiones con deficiencias en niveles de Vitamina E en la dieta. Lovell *et al.* (1984), describió lesiones como severa atrofia y necrosis de las fibras musculares en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alimentadas con dietas de niveles bajos de α -tocoferol. Murai y Andrews (1974), también describieron cambios histológicos pronunciados en las fibras musculares y distrofia muscular en peces de la misma especie alimentados con bajos

niveles de vitamina E, además con la carencia de esta vitamina, en dietas con altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, llevan a cambios oxidativos en los lípidos (rancidez), si están almacenadas en altas temperaturas y expuestas al oxígeno atmosférico. No se puede afirmar algunas de las posibles causas de las lesiones encontradas a nivel muscular en el presente estudio, para ello es necesario realizar otro tipo de estudio como análisis del alimento. Sin embargo, se podría descartar lesiones asociadas a rancidez de las grasas debido a que no se encontraron además lesiones de necrosis a nivel epitelial del tubo digestivo, lo cual podría sugerir que las lesiones de necrosis y atrofia muscular estarían estar asociadas a deficiencia de vitamina E. Para ello se recomienda realizar estudios de análisis de alimento destinados a los peces ornamentales.

En el presente estudio se identificaron 6 géneros bacterianos: *Flavobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.* y 1 familia *Enterobacteriaceae*, que crecieron en el Agar TSA y Agar Cytophaga a partir de las muestras de riñón y bazo analizados, mientras que no se obtuvieron aislados de *Mycobacterium sp.* en el agar Middlebrook 7H9. A pesar de los aislamientos bacterianos del riñón, no se observó lesiones características por estos agentes en este órgano, debido a que, la presentación de la enfermedad en los peces se basa en un complejo formado por el pez, ambiente y patógeno. Siendo el pez susceptible cuando su medio acuático se ve alterado, lo cual es aprovechado por el patógeno para su presentación (Francis-Floyd, 2009; Palmeiro, 2010), sin embargo, la enfermedad rara vez va a desarrollar por el simple contacto del patógeno y el hospedero (Parker, 2012). Esto puede sustentarse con lo observado también por Del Rio Rodríguez y Tumbull (1999) en un estudio de la microflora aeróbica de 120 peces ornamentales importados de Sudamérica y Singapur, donde se aislaron de muestras de órganos internos: especies de *Aeromonas*, con prevalencias de 3.3 a 43.3% y *Pseudomonas* Grupo 1, con una prevalencia de 3.3 a 30%, provenientes de los peces de Singapur; y especies de *Aeromonas*, *Pseudomonas* Grupo 2, *Flavobacterium* y *Plesiomonas shigelloides*, provenientes de peces de Sudamérica. Recientes estudios confirman que animales acuáticos clínicamente sanos pueden contener bacterias dentro de sus órganos internos sin mostrar signos clínicos ni lesiones orgánicas. Asimismo, Chowdhury *et al.* (1997), aislaron un rango de géneros de bacterias: *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Coryneforms*,

Aeromonas, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, y *Enterobacteria* en el pez *Puntius gonionotus*; siendo estos peces muestreados al azar.

Además, se observaron múltiples granulomas de diversos tamaños. Estos granulomas son característico en algunos procesos infecciosos de tipo bacteriano como: *Streptococos sp.* y *Edwarsiella tarda* , a pesar de que esos géneros no fueron aislados en este estudio, esto permite confirmar la presencia de bacterias patógenas en los neones tetras.

VI. CONCLUSIONES

1. Causas infecciosas de tipo parasitario fueron las de mayor frecuencia en los peces neón tetra (*Paracheirodon innesi*), siendo *Microsporidium sp.* los más frecuentemente determinados en diversos tejidos.
2. El neón tetra, pueden ser infectado por más de un género de *Microsporidium* a la vez, identificándose por su morfología al *Pleistophora sp.* y *Heterosporis sp.* por primera vez descrito en el país.
3. El músculo fué el tejido donde más agentes infecciosos fueron identificados.
4. Se aislaron bacterias potencialmente patógenas tales como: *Flavobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.* y 1 familia: *Enterobacteriaceae* indistintamente de riñón y bazo.
5. A pesar de no haberse encontrado lesiones histopatológicas característicos de los agentes bacterianos aislados, en los órganos internos estudiados, se pudo observar múltiples granulomas de diversos tamaños, característicos en algunos procesos infecciosos de tipo bacteriano, confirmando así la presencia de bacterias patógenas en los neones tetras.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda a los centros de acopiadores, acuaristas profesionales y acuaristas a menor escala, cuenten con sistemas periódicos de monitoreo clínico y dentro de ellos el sanitario que incluyan una evaluación histológica y microbiológica que permita identificar su estado de salud de los peces ornamentales.

VIII.LITERATURA CITADA

1. **Akiyoshi H, Inoue A.2004.** Comparative histological study of teleost livers in relation to Phylogeny .Zoological Science. 21:841-850.
2. **Alcántara F.1991.**Situación de la Piscicultura en la Amazonía Peruana y estrategia para su desarrollo. Folia Amaz.IAP.3:81-94
3. **Altringham J, Ellerby D.1999.** Fish swimming: patterns in muscle function. The Journal of Experimental Biology.202: 3397-3403
4. **Amlacher E.1961.** Manual de enfermedades de peces.España:Acribia.p24-32
5. **Auro A, Ocampo L.1999.**Diagnóstico del estrés en peces.Vet. Méx. 30(4): 337-344.
6. **Austin B, Austin D.2007** Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish.4^a ed. Chichester: Germany. 575p.
7. **Azevedo C, Matos E. 2003.** Fine structure of *Henneguya pilosa* sp.n (Myxozoa:Myxosporidae),parasite of *Serrasalmus altuvei* (Characidae),in Brazil. Folia Parasitológica.50:37-42.
8. **Barassa B, Adriano E, Arana S,Cordeiro N.2003.** *Henneguya curvata* sp.n.(Myxosporea:Myxobolidae) Parasiting the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae:Serrasalminae),a South american freshwater fish.Folia Parasitológica.50:151-153.
9. **British Veterinary Association Animal Welfare Foundation. 2009.** Ornamental fish keeping. London: BVA Animal Welfare Foundation .Serie de Folletos Informativos.8p.
10. **[BTFFP] Bio Trade Facilitation Programme. 2005.** Diagnóstico del sector Acuicultura para el desarrollo de bionegocios en el Perú-Programa BTFFP. Lima. 96p.
11. **Buller N. 2004.** Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. 1^a ed. London : CABI.361p.

12. **Carnevia D, Letamendia M, Peretta A, Delgado E. 2010.** Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales de Uruguay Veterinaria. 55(46)N° 177-180:27-31.
13. **Cepeda R, Orostegui C. 2000.** Histología de Peces. Universidad de Chile.
14. **Centeno L, Silva - Acuña A, Silva-Acuña R, Pérez J. 2004.** Fauna ectoparasitaria asociada a *Colossoma macropomum* y al híbrido de *C. macropomum* x *Piaractaus brachypomus*, cultivados en el estado delta Amacuro, Venezuela. Biagro. 16(2): 121-126.
15. **Corral L, Grizel H, Polanco E. 2000.** La acuicultura: Biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. Tomo I. Análisis del desarrollo de los cultivos: Medio, agua y especies. Fundación Alfonso Martín Escudero .España: Mundi -Prensa.
16. **Cotran R, Kumar V ,Collins.2000.** Patología estructural u funcional de Robbins.6ed. Mc Graw Hill Interamericana.
17. **Cowey C, Roberts R.1981.** Patología de la nutrición de los teleósteos. En: Roberts R, eds. Patología de los peces. Madrid: Mundi -Prensa. p 249-261.
18. **Cumbicus A, López M. 2011.** Síntesis Económica de Loreto Enero 2011. Departamento de Estudios Económicos. Banco Central de Reserva del Perú Sucursal Iquitos.
19. **Chong A, Hashim R, Ali Ab. 2003.** Assessment of soybean meal in diets for discus (*Symphysodon aequifasciata* HECKEL) farming through a fishmeal replacement study. Aquacult Res; 34(11): 913-922.
20. **Chowdhury M, Karim S, Islam M.1997.** Bacterial flora in the slime and kidney of rajputi (*Puntius gonionotus*) in two fish farms of Bangladesh. En: Flegel T, MacRae I, eds. Diseases in Asian aquaculture III. Fish health section, Asian Fisheries Society, Manila. p. 95-100.
21. **Choresca C, Gómez D, Shing S, Kim J, Han J, Jun J, Park S.2011.** Molecular detection of *Edwardsiella tarda* with *gyrB* gene isolated from pirarucu ,*Arapaima gigas* which is exhibited in an indoor private commercial aquarium. African J. of Biotech.10 (5):848-850.

22. **Decostere A, Haesebrouck F, Deuriese L.1998.**Characterization of four *Flavobacterium columnare*(*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish.Vet.Microbiol.62(1): 35-45.
23. **De Castro S y Pérez J.2007.**Manual de patología general.1ed .España: Elsevier. p:303-310
24. **Del Río-Rodríguez R, Turnbull J.1999.**Aerobic microflora of imported tropical ornamental fish from Singapore and South America .Fish Vet. J. 4:1-16.
25. **Dyková I, Lom J.2006.**Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitológica.53:1-36
26. **[DIREPE/MIPE] Dirección Regional de Pesquería / Ministerio de Pesquería.1986.** Cuadros estadísticos de comercialización de recursos hidrobiológicos. Dirección Regional de Pesquería de Loreto.10pp.
27. **El alquimista de los acuarios. 2013.** Lima. [Internet], [25 Febrero].Disponible en: <http://www.alquimistadeacuarios.com>
28. **Ellerby D, Altringham T, William T, Block B.2000.**Slow muscle function of pacific bonito (*Sarda chilensis*) during steady swimming. The Journal of Experimental Biology. 203: 2001-3403.
29. **Ellis A.1981.**Inmunología de los teleósteos. En: Roberts R, eds. Patología de los peces. Madrid: Mundi -Prensa. p 103-117.
30. **Ellis A, Roberts R, Tytler P.1981.**Anatomía y fisiología de los teleósteos .En Roberts R, eds. Patología de los peces. Madrid: Mundi - Prensa. p 15-61.
31. **Eiras J, Malta J, Varella A, Pavanelli G. 2005.** *Myxobolus insignis* sp.n.(Myxozoa,Myxosporea,Myxobolidae),a parasite of the Amazonian teleost fish *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes ,Prochilodontidae). Mem.Inst.Oswaldo Cruz Río de Janeiro. 100(3): 245-247.
32. **Evans D, Piermarini P, Potts W. 1999.** Ionic transport in the fish gill epithelium. Journal of experimental zoology.283:641-652.

33. **Evans D, Piermarini P, Choe K.2005.** The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85:97-177.
34. **Farhadi A, Banan A, Fields J ,Keshavarzian J.2003.**Intestinal barrier : An interface between health and disease.*Journal of Gastroenterology and hepatology.*18(5):479-497.
35. **Feist S, Longshaw M.2000.** Myxosporidiosis of fish and the bryozoan link with proliferative kidney disease (PKD) of salmonids. *Fish veterinary Journal* 5: 37-46.
36. **Ferguson H.2006.** Systemic pathology of fish .A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease.2ª ed.Iowa: Scotian Press. 367 p.
37. **Fosså S .2004.** Man-made fish: Domesticated fishes and their place in the aquatic trade and hobby.OFI J.44:1-22. [Internet],[22 setiembre 2013].Disponible en :<http://www.ornamental-fish-int.org>
38. **Francis R.2003.**Dissolved oxygen for fish production. Florida: University of Florida IFAS Extension. Serie de documentos.[Internet], [23 setiembre 2013]. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA00200.pdf>
39. **Francis – Floyd R.2009.** Stress-Its role in fish disease .Florida: University of Florida IFAS Extension. Serie de documentos. CIR 919.[Internet],[23 setiembre 2013] . Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA00500.pdf>
40. **Gallo R. 1999.** Situación del manejo de las pesquerías de grandes bagres migratorios amazónicos en el Perú. Taller sobre manejo de las pesquerías de bagres migratorios del Amazonas. COPESCAL, FAO. 23 pp.
41. **Gonzalez J, Heredia B.1998.** Cultivo de la cachama (*Colossoma macropomum*).Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Guárico .Maracay, Venezuela.p134.
42. **Guillaume J, Kauskik S,Bergol P, Metaller R.2004.** Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Madrid: Mundi prensa. 475p.
43. **Herbert R, Axelrod, Dauner E.2002.** Enciclopedia de peces de acuario de agua dulce. 1ªed.Hispano Europea, S.A.1010p

44. **Hibiya T, Yokote M, Oguri M, Sato H, Takashima F, Aida K.1982.** An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Tokyo: Kodansha. 147p.
45. **Hignette M. 2003.** L'aquariophilie et le commerce des poissons d'ornement. Bull.Soc.Zool.Fr.129 (1-2):67-74.
46. **Hordvik I, Thevarajan J, Samdal I, Batani N, Krossoy B.1999.** Molecular cloning and phylogenetic analysis of the atlantic salmon immunoglobulin D gene. Scand.J. Immunol. 50:202-210.
47. **Huanqui G. 2005.** Aspectos sociales y de comercialización de los peces ornamentales en el Perú. En: Memorias Taller Internacional. Bogotá. Aspectos socioeconómicos y de manejo sostenible del comercio internacional de peces ornamentales de agua dulce en el norte de Sudamérica: retos y perspectivas.
48. **Humphrey J, Lancaster C, Gudkovs N, McDonald W.1986.** Exotic bacterial pathogens *Edwardsiella tarda* and *Edwardsiella ictaluri* from imported ornamental fish *Betta splendens* and *Puntius conchonius*, respectively: isolation and quarantine significance. Austarl.Vet.J. 63(11):369-371.
49. **Huttenhuis H.2005.** The ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) immune system. Doctoral Degree Thesis. Wageningen University, department of Animal Sciences, Cell Biology and Immunology Group.
50. **Instituto Tecnológico Pesquero del Perú – ITP - SANIPES. 2013.** Lima. Ministerio de la Producción. [Internet], [20 setiembre 2013]. Disponible en: <http://www.itp.gob.pe/desarrollo-sanipes.php>
51. **Ismiño R, Araujo C.2002.** Efecto del amoníaco sobre el crecimiento de la gamitana *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1818). Folia Amazónica. 13:1-2.
52. **Jiménez J. 2007.** Principales enfermedades en peces de acuario. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Michoacán: Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
53. **Jubb K, Kennedy P, Palmer N. 2007.** Pathology of Domestic Animals. 5th ed. USA: Academic Press Inc. 653 p.

54. **Kallert D. 2006.**Life cycle studies and transmission mechanisms of myxozoan parasites. Doctoral Degree Thesis. The scientific faulties of the Friedrich-Alexander-Universitat Erlangen-Nürnberg.
55. **Kalogeropoulos N, Alexis M, Henderson R.1992.** Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead (*Spaurus aurata*).Aquaculture.104:293-308.
56. **Kinkelin P,Michel C, Ghittino P. 1991.**Tratado de las enfermedades de los peces. España: Acribia. p 15-19
57. **Kiessling A, Ruohonem K, Bjornevik M.2006.** Muscle fibre growth and quality in fish.Arch.Tires.49:137-146.
58. **Lambert G.2003.** Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. Journal of Animal Science. Abstract.
59. **La Torre D, Brunner M .2007.** Impacto de la pesquería en el aspecto socio-económico en la comunidad de Santa Clara de Nanay –Loreto, Perú. Tesis de Biólogo. Iquitos: Univ. Nac. de la Amazonía Peruana .89p.
60. **Ling K, Lim L .2006.** The status of ornamental fish industry in Singapore.Singapore J. Pri Ind.32: 59-69.
61. **Livengood E, Chapman F .2007.** The ornamental fish trade: An introduction with perspectives for responsible aquarium fish ownership. Florida: University of Florida. IFAS Extension. Serie de documentos FA 124 [Internet],[22 setiembre 2013].Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA12400.pdf>
62. **López-Dóriga M, Martínez J.1998.** Ultrastructure of fish cells involved in cellular defences against *Saprolegnia* infections: evidence of non-leucocytic nature.Dis.Aquatic.Org.32:111-117.
63. **Lovell R,Miyazaki T,Rabegnator S.1984.**Requirement for α-tocopherol by channel catfish fed diets low in polyunsaturated triglycerides.J.Nutr.114:894-901.
64. **Martins M, Souza V, Moraes J, Moraes F, Costa A.1999.** Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with myxosporean parasites and tissue changes in the host. Rev. Brasil. Biol. 59(2):263-269.

65. **Meyer C, Ganter M, Korting W, Steinhagen D.2002.** Effects of a parasite induced nephritis on osmoregulation in the common carp *Cyprinus carpio*. *Dis.Aquat.Org.*50:127-135.
66. **Miller- Morgan T.2010.** A brief overview of the ornamental fish industry and hobby. En: Roberts H. ed. *Fundamentals of ornamental fish*.1ª ed. Iowa: Wiley –Blackwell Publishing. p 25-26.
67. **Miller S, Mitchell M.2009.**Ornamental fish .En: Mitchell M, Tully T, eds .*Manual of exotic pet practice*. 1ª ed. Missouri: Saunders Elsevier. p 39-43
68. **Mohanty B, Sahoo P.2007.**Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J. Biosci.* 32(7):1331-1344
69. **Mulero V, García A, Mesequer J.2005.** What can we learn from fish? An evolutionary perspective of pro-inflammatory cytokines.*Inmunología.*24 (1):17-22.
70. **Murai T, Andrews J.1974.**Interactions of dietary α -tocopherol , oxidized menhaden oil and ethoxyquin on channel catfish(*Ictalurus punctatus*).*Nutr.*104:1416-1431.
71. **Musa N, Seong Wei L, Shaharom F, Wee W.2008.** Surveillance of bacteria species in diseased freshwater ornamental fish from aquarium Shop.*World Appl.Sci.J.*3 (6):903-905.
72. **Negrete P, Romero J. 1999.** Presencia de bacterias patógenas en peces de ornato. *Hidrobiológica.*9:85-94.
73. **Nelson J. 2006.** *Fishes of the World*.4 ed. New York: Jhon Wiley and Sons601p.
74. **Noga J.2000.** *Fish Disease. Diagnosis and treatment*.1ª ed. USA: Iowa State University Press. 497p.
75. **Oestman D. 1998.** Problemi ambientali e sanitari negli acquari marini ornamentali.*Vetrinaria.*12(4):99-111.
76. **Ortiz N, Iannacone J. 2008.** Estado actual de los peces ornamentales amazónicos del Perú que presentan mayor demanda de exportación. *Biol* 6(1): 54-67
77. **Padrós F, Furones M.2007.** Patología bacteriana en piscicultura.*Actualidad SEM* 34:13-21
78. **Palmeiro B.2010.** Bacterial disease of fish. En: Roberts H, ed. *Fundamentals of ornamental fish*. 1ª ed. Iowa: Wiley – Blackwell Publishing.p125-136.

79. **Panné S, Luchini L.2008.** Panorama actual de comercio internacional de peces ornamentales. Buenos Aires. Portal del Ministerio de Agricultura. [Internet],[01 setiembre 2013]. Disponible en:
http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/_archivos/08110_Panorama%20actual%20de%20comercio%20internacional%20de%20Peces%20Ornamentales.pdf?PH_PSESSID=843012057c8c6ddb0842c406ff0c76a2
80. **Parker R. 2012.** Aquaculture Science.3ª ed. Nueva York: Delmar CENGAGE Learning.652 p
81. **Pasnik D, Evans J, Klesius P.2010.** Stress in fish. En: Roberts H, ed. Fundamentals of ornamental fish. 1ª ed. Iowa: Wiley – Blackwell Publishing.p 33-34.
82. **Petracini R. El acuarista: Acuariofilia y disciplina afines. 2013.** [Internet], [25 Febrero].Disponible en: <http://www.elacuarista.com>
83. **Ploeg A.2007.** Import and Export Legislation .Ornamental Fish International. [Internet], [01 agosto 2013].
Disponible en: <http://www.ornamental-fish-int.org/files/files/legislation.pdf>
84. **Plumb J.1999.** *Edwardsiella* septicaemias. En: Woo PTK y Bruno DW, eds. Fish diseases and disorders. Volumen 3: Viral, bacterial and fungal infections. Oxfordshire : CAB International.479-493.
85. **Portal Acuariofilia .2013** .Lima: Sitios España. [Internet], [25 Febrero].Disponible en: <http://www.sitiosespana.com/notas/2010/octubre/tetra-neon.htm>
86. **Reimschuessel R, May E, Bennett R, Lypsky M. 1988.** Necropsy examination of fish. Vet. Clin. North Am.: Small Animal Practice. 18: 427-433.
87. **Reimschuessel R, May E, Bennett R, Lypsky M.1992.** Communications A Clasification System for Histological lesions.Journal of Aquatic Animal Health 4:135:143.
88. **Reimshuessel R.2001.** A fish model of renal regeneration and development. ILARL. Journal 42(4): 285-291.

89. **Rescan P, Collet B, Ralliere C, Cauty C, Delalande J, Goldspink G.2001.**Red and white muscle development in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) as shown by in situ hybridization of fast and slow myosin heavy chain transcripts. The Journal of Experimental biology.204:2097-2101.
90. **Reyna S.1993.**Patología celular y tisular .En: Trigo F, Poumián A, eds. Patología general veterinaria. México: Nueva Editorial Interamericana.p26-30.
91. **Roberts J, Shepherd J.1980.**Enfermedades de la trucha y el salmón .ed. España: Acribia .p 17-18.
92. **Roberts H ,Palmeiro B , Weber E.2009.** Bacterial and parasitic diseases of pet fish. Vet Clin. Of North Am. Exotic Animal Practice. Bacterial and parasitic diseases 12(3): 609-638.
93. **Roberts R.2001.** Fish pathology.3ª ed.Londres: W.B. Saunders.412p
94. **Rocha E, Monteiro R, Pereira C.1994.** The liver of brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. J.Anat. 185(2): 241-249.
95. **Rodríguez A,Gomez J, Mohamad J,Jimenes L, Rubial S.2004.**Tratado de histología veterinaria .España: Masson p. 281-293.
96. **Rojas, J. 1972.** Establecimiento de Cooperativas en peces Ornamentales en Iquitos. Tesis para optar Título Profesional de Biólogo. UNAP, Iquitos. 70 pp.
97. **Ross L, Ross B.2008.** Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals.3 ed.Editorial Blackwell Publishing .222p
98. **Rosenthal S.2007.**Frecuencia de lipidosis hepática en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. Tesis de Médico veterinario .Lima: Univ.Nac.Mayor de san Marcos.69p
99. **Ruíz A, Souza J, Vela U .2003.** Análisis situacional de la pesquería ornamental en Iquitos y áreas de influencia-base para una propuesta de manejo. Tesis para optar el Titulo de maestría UNAP-IQUITOS 176pp.
100. **San Román J, Barletti J, Gadea. 1977.** Estudio socio económico de los ríos Amazonas y Napo. Vol-II. IPA, Publicaciones CETA. Iquitos. p. 11-15.

101. **Shotts E, Starliper C.1999.** Flavobacterial diseases: Columnaris disease, Cold-water disease and bacterial gill disease. En: PTK Woo &DW Bruno. eds: Fish diseases and disorders, Volumen 3:Viral,bacterial and fungal infections. p 569-576
102. **Southgate P.2000.** Enfermedades en Acuicultura. En: Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. España: Acribia p95.
103. **Spiegel M.1991.** Estadística.2ª ed. Estados Unidos: Mc Graw Hill.186p.
104. **Stephens J, Jones J, Hillier P.2010.** Ornamental fish testing project. Final Report. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Biosecurity. Australian Government. [Internet], [15 setiembre 2013]. Disponible en: http://www.daff.gov.au/data/assets/pdf_file/0014/1103171/2009_06b_WA_Fisheries_finfish_testing_report.pdf
105. **Su Hsien T, Quintanilla M .2008.** Manual sobre reproducción y cultivo de Tilapia. Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA). El Salvador.
106. **Sunyer J, Tort L, Lambris J.1997.** Diversity of the third form of complement, C3, in fish: Functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. Biochem .J. 326: 877-881.
107. **Srinivasa Rao, Yamada Y, Tan Y, Leung K.2004.** Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. Infect.Immun.71:1343-1351.
108. **Swain P, Dash S,Sahoo P,Routray P, Sahoo S,Gupta s.2007.** Non-specific immune parameters of brood indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish & Shellfish Immunology.22:38-43.
109. **Tacon A.1992.** Nutritional fish pathology morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO Fish Technical Paper.p75.
110. **Tello S, Cánepa J. 1991.** Estado Actual de la Explotación de los Principales Peces Ornamentales de la Amazonia Peruana. Folia Amazónica IIAP Vol. Nº 3.

Comentario [M10]:

111. **Tresierra A, Flores L, Chuquipiondo C, García M, Mori T , Bardales J. 2008.** Ectopatógenos bacterianos aislados de pimelódidos ornamentales procedentes de la Cuenca del río Nanay, Iquitos-Peru. REBIOL.VOL.28, N° 2: Julio- Diciembre.
112. **Tripathi N, Latimer K, Rakich P.2003.** Columnaris disease in freshwater fish. Vetlearn.com 25(7) [Internet], [25 Noviembre 2013]. Disponible en: http://cp.vetlearn.com/Media/PublicationsArticle/PV_25_07_528.pdf.
113. **Tort L, Balasch J, Mackenzie S.2003.** Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Inmunología.22 (3):277-286.
114. **Vandepitte J, Lemmens P, De Swet L.1983.** Human edwardsiellosis traced to ornamental fish. Amer. of Clin.Microbiol.17:165-167.
115. **Verján N.2002.** Sistematización y caracterización de las enfermedades de la Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en algunas regiones de los Llanos orientales y estudio de la Enfermedad septicémica. Tesis de Maestría en Salud y Producción Animal. Univ. Nac. de Colombia.
116. **Vigliano F, Quiroga M, Nieto J.2002.** Adaptaciones metabólicas y realimentación en peces. Rev,ictiolo.10 (1/2):79-1068
117. **Vicentini C, Franceschini-Vicentini I, Bertolucci M, Santos A.2005.** Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. Int. J. Morphol. 23(3): 211- 216
118. **Witters H.1998.** Disorders associated with environmental pH. En: Leatherland J, Woo P, eds. Fish diseases and disorders.Volumen2:Non –infectious disorders. p 187-206.
119. **Wolf K, Markiw M.1984.** Biology contravenes taxonomy in the Myxosoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science. 225:1449-1452.

120. **Wolf J, Wolfe M.2005.**A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. Toxicologic Pathology. 33(1):75-85.
- 121.**Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez –de Frias C, Cortés A .2006.**Ontogeny of the immune system of fish. Fish &shellfish Immunology .20(02):126-136.
122. **Zwollo P, Cole s, Bromage E,Kaattari S.2005.**B Cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney.the Journal of Immunology.174:6608-6616.

IX.APÉNDICE

ANEXO 1:

Tinción GRAM

Utilizada para determinar si la cepa bacteriana es Gram-negativa o Gram-positiva. Esta tinción detecta una diferencia fundamental en la composición de la pared celular de las bacterias.

A. Preparar un frotis de bacterias de un cultivo puro

- 1.Poner una gota de solución salina, agua destilada, o PBS en una lámina portaobjetos de vidrio limpio.
- 2.Con la ayuda de un asa de siembra o una aguja estéril, tocar una colonia aislada y mezclar en la gota de agua.
- 3.Mezclar hasta que esté ligeramente turbia (el exceso bacteriano no permite una tinción correcta).
- 4.Dejar secar al aire y fijar al calor. No sobrecalentar, la lámina no debe estar demasiado caliente al tacto.
- 5.Dejar que se enfríe

B.Cubrir la lámina con cristal violeta, y dejar que permanezca en la lámina durante 60 segundos.

C. Lavar el cristal violeta con agua del grifo.

D. Cubrir la lámina con lugol, y dejar que permanezca en la lámina durante 60 segundos.

E. Lavar con agua corriente

F. Agregar alcohol al 95% y solución de acetona al 5% hasta que decolore la lámina (aproximadamente 5-10 segundos). Se debe evitar la decoloración excesiva ya que puede resultar en un falso gram-negativos en la lectura.

G. Enjuagar inmediatamente con agua corriente del grifo.

F. Cubrir la lámina con fucsina básica, durante 60 segundos.

H. Lavar con agua del grifo y dejar secar al aire.

Resultado

a. Gram-negativas son las células que se decoloran por la solución de alcohol-acetona y asumen una coloración que va de rosa a fucsia.

b. Gram-positivas son aquellas células que retienen el cristal violeta y asumen una coloración que va de púrpura a azul oscuro.

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 y (succínicos 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 acetona 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 acetona 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 evolucionen 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 terroso. 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. 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 (CO₂), junto con la producción o no de ácido sulfhídrico (H₂S). 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 descarboxitasas que atacan el aminoácido lisina, con liberación de aminos 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.

H. 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 sulfanilico 1 ml.

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

I. AGAR TSI (Triple Sugar Iron o Triple Azúcar Hierro)

Este medio determina la capacidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (H₂S). El medio contiene 1 parte de glucosa y 10 partes de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de H₂S. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de H₂S se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.

J. PRUEBA DE HUGH y LEIFSON

Esta prueba se realiza para la determinación del metabolismo oxidativo o fermentativo de los carbohidratos.

Para cada microorganismo a identificar, se inoculan por punción dos tubos de medio. En uno de los dos tubos se cubre la superficie con parafina estéril para crear condiciones de anaerobiosis. La producción de ácido se evidencia por el cambio de color de púrpura a amarillo. Los microorganismos fermentadores producen ácido en ambos tubos, los microorganismos oxidadores (respiradores) sólo lo producen en el tubo sin parafina.

ANEXO 3

Protocolo para el procesamiento de muestras para histopatología

