

CALDO NUTRITIVO

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Agua destilada	1000.0	ml

Disolver los ingredientes, esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 min.

REACTIVO PARA PRUEBA DE OXIDASA

Clorhidrato de tetra-metil-p, fenilendiamina	1.0	g
Agua destilada	100.0	ml

2. Suspender los ingredientes en el agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición agitando ocasionalmente hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Inclinare los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1 a 1.5 cm.

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000.0	ml

5. Agregar la peptona al agua y dejar reposar por 15 a 30 min. Calentar para disolver la gelatina, agregar y disolver los otros ingredientes. Esterilizar en autoclave a 12 lb durante 15 min.

CALDO TRIFTONA

Disolver 10 g de tripón en un litro de agua destilada, distribuir en porciones de 2 ml a tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a 12 lb durante 15 min.

MICOLOGIA DE PECES

METODOS PARA DETECCION DE ALGUNAS ENFERMEDADES MICOTICAS

Juan Manuel Adame Rodríguez y Fernando Jiménez Guzmán
Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

INTRODUCCION

Las enfermedades micóticas en peces se conocen desde hace muchos años, Huxley 1882, Murray 1885, Hofer 1893. estas micosis para su estudio han sido clasificadas por su forma de afectar a los peces como micosis superficiales o externas y sistémicas o internas, esto aunado a la forma, dimensiones y requerimientos nutricionales de los hongos son los aspectos que determinan las técnicas de laboratorio que deben ser utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad.

PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA MICOLOGIA

Infecciones Externas

Aunque algunas infecciones micóticas son visibles a simple vista, todas las superficies del cuerpo y branquias deben ser examinadas cuidadosamente, tratando de observar masas algodonosas, nódulos u otras lesiones epiteliales indicativas de la presencia de hongos, por lo que deben practicarse preparaciones semipermanentes (montajes en fresco) a partir de las lesiones así como también del moco desprendido de la superficie del pez, las muestras tomadas deben examinarse al microscopio con poco aumento.

Infecciones Externas

Después de que el pez ha sido disectado y se han colectado las muestras bacteriológicas, se examinan los órganos cuidadosamente en búsqueda de quistes, nódulos o algún signo de apariencia inusual, en las branquias, cerebro, bazo y otras visceras deberán revisarse con lente de mano (lupa), o al microscopio estereoscópico para después realizar preparaciones semipermanentes (en fresco) de todos los tejidos sospechosos, el examen microscópico debe ser hecho a todas las muestras en preparaciones semipermanentes (en fresco) y observadas a seco débil y seco fuerte. en ambos casos la fijación y preservación se efectúa colocando las muestras en una solución de formol al 10%.

Mientras que Las preparaciones en fresco se pueden manejar con KOH al 4%, DMSO (dimetilsulfoxido), o azul de lactofenol.

Para el procesamiento histológico después de utilizar las técnicas comunes se recomienda la tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff), o Gormori-Grocott, para tinciones diferenciales. con objeto de destacar las características del hongo.

La muestra que se utilice para cultivo debe lavarse en solución salina y flamearse su superficie, posteriormente sembrar en el medio de cultivo que se recomiende según la naturaleza del patógeno buscado. (A. saboraud, PDA, etc.).

ICTIOFONIASIS

El agente causal de la Ictiofoniasis es *Ichthyophonus hoferi* el cual también ha sido llamado por algunos *Ichthyosporidium hoferi*.

Rango de Hospederos y Distribución Geográfica

Principalmente lo encontramos en cultivos de trucha en el oeste de los Estados Unidos de Norteamérica, peces marinos y de acuario, Post menciona 73 especies de peces entre marinos y de agua dulce susceptibles de contraer esta enfermedad, su distribución es mundial con predominancia en los climas templados., carece de especificidad de hospederos. otros hongos parecidos han sido reportados en anfibios, pero se desconoce si son similares a las formas observadas en peces. *Ichthyophonus* ha sido encontrado en carpa, trucha, y salmón esto sucede cuando son alimentados con peces o restos de peces enfermos o portadores ,o bien cuando se permite la acumulación de esporas en los estanques es muy elevada.

Signos Clínicos de Importancia Diagnóstica

El pez infectado deja de comer y presenta letargia en casos agudos, pudiendo desarrollar deformidades en la espina dorsal, nódulos en el riñón, hígado, y músculo, así como las esporas en el bazo y cerebro ,en infecciones crónicas no se desarrollan signos visibles.

Procedimientos diagnósticos para infecciones localizadas

Examine preparaciones semipermanentes (en fresco) de tejido de riñón u otro tejido sospechoso, se observan cuerpos esféricos de tamaño variable dentro del rango de 10 a 100 micras se observan esferas unidas a protuberancias hifales., esos tubos germinativos son de importancia diagnóstica.

Procedimientos para detectar infecciones asintomáticas

Las infecciones asintomáticas son muy difíciles de diagnosticar por lo que algunos autores han llegado a sugerir que se requiere hasta de un 5% de la población de cada lote de peces ,en estos casos se recomienda tomar improntas de riñón fijadas al aire y tenidas con azul de metileno, como una forma rápida y selectiva de casos, dado el elevado volumen de muestras.

En la actualidad se desconocen métodos serológicos precisos o de otro tipo, por lo que se recomienda el cultivo de este hongo en agar saboraud enriquecido con suero fetal de ternera al 1%.

Transporte de las Muestras

Se recomienda que sean peces vivos o muestras sean frescas de tejido infectado, las cuales pueden estar congeladas sin alterar por esto la morfología del hongo pero se desconoce el efecto sobre su viabilidad

SAPROLEGNIASIS

Este es el nombre común que reciben las micosis superficiales causadas por hongos acuáticos saprófitos como son los géneros *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces*, *Leptomitium*, *Phytium*, los cuales ocasionalmente pueden invadir piel aparentemente sana lo que sucede cuando los peces sufren de stress por shock térmico en este caso se consideran infecciones primarias, cuando se establecen en llagas y lesiones de otro origen las infecciones se consideran secundarias. estos hongos deben ser cultivados para su diagnóstico.

En muchas especies de peces la invasión de huevos por estos hongos es muy común, por lo que se refleja en grandes pérdidas.

Distribución Geográfica

Estos hongos se distribuyen mundialmente y se encuentran habitualmente en agua dulce y salobre, algunos también pueden aislarse en suelos húmedos, la salinidad superior a 2.8% limita su distribución. sus zoosporas pueden también ser transportadas por el aire. todos los peces de agua dulce y los huevos son susceptibles de adquirir saprolegniasis.

Signos Clínicos de Importancia Diagnóstica

La presencia de masas algodonosas de color blanco grisáceo o pardo (debido a el detritus que se adhiere), en la piel, aletas, branquias y ojos es posible considerarlo como diagnóstico presuntivo para iniciar un tratamiento

Procedimientos para el Diagnóstico

Se toma una pequeña muestra de micelio , se monta en KOH al 4% entre porta y cubreobjetos para su observación al microscopio, notándose micelio ramificado , cenocítico, con zoosporangios en el apice micelial de diferentes formas según el género que se trate (ver figuras). para la identificación del género podemos cultivarlo si fuera necesario en agar saboraud con semillas de maíz hervidas a manera de trampas o cebo.

BRANQUIOMICOSIS

Branquiomyces demigrans y *B. sanguinis* son agentes etiológicos de la enfermedad conocida como branquiomicosis ,estos hongos invaden los vasos sanguíneos de las branquias, y se ha observado una mayor prevalencia en peces cultivados en aguas cálidas y con alto contenido de materia orgánica, estos hongos pueden ser reconocidos dentro de los filamentos branquiales, en preparaciones semipermanentes (en fresco.).

Distribución Geográfica

Este hongo ha sido detectado en Alemania, Checoslovaquia, Polonia, Italia, Rusia, Japon, India, y Estados Unidos de America., Post menciona que probablemente todas las especies de peces son susceptibles de contraer esta enfermedad.

Signos Clínicos de Importancia Diagnóstica

Existen dos especies del género *Branquiomycetes*, *B. demigrans* y *B. sanguinis* en ambas la via de infección es el agua, las esporas presentes se fijan en los filamentos branquiales donde se establecen. *B. demigrans* se localiza unicamente en el epitelio debido a que requiere una baja tension de oxigeno, mientras que *B. sanguinis* invade los capilares formando trombos que obstruyen el flujo sanguineo lo que propicia necrosis del tejido.

Los peces con procesos agudos y subagudos pueden mostrarse letárgicos, el curso agudo de la enfermedad suele presentarse durante los meses cálidos, en este caso las branquias pueden aparecer con un color rojo brillante o con zonas blancas o color café según el grado de necrosis.

Procedimientos de Laboratorio para Branquiomycosis

Las agallas deben ser disectadas y el hongo cultivado en un medio artificial, una parte del tejido branquial invadido debe ser depositado en un portaobjetos con una pequeña cantidad de agua y aplanado con una varilla de vidrio a manera de extender la muestra, esto hace que el hongo se separe del tejido, el material así tratado se transfiere a un tubo de centrifuga, se le adiciona agua y se centrifuga por 3 minutos, en este proceso tanto el tejido como el hongo se sedimentan formando un boton al fondo del tubo, despues se decanta la fase acuosa y se remplaza por agua destilada y se centrifuga de nuevo, el cambio de agua se realiza por varias ocasiones hasta que el agua quede totalmente transparente. a partir de este momento la muestra puede usarse para observaciones al microscopio o bien para el cultivo del hongo, en el último caso se recomienda que la muestra sea sumergida en una solución de formalina al 2% por 2 minutos esto destruye a las bacterias pero no al hongo, el cual debe transferirse al medio de cultivo con una pipeta estéril

Los medios de cultivo recomendados son agar saboraud's, agar con glucosa peptonizada y extracto de carne al 3%.

El hongo obtenido durante la examinación del pez o por cultivo en medio artificial puede ser teñido por el método de Swartz-Cooledge, modificado por Pejsa para una identificación mas precisa. el hongo o una porcion del tejido atacado por el, deben sumergirse por un lapso de 5-60 minutos en KOH al 15%, lavarse en agua corriente y transferirse a un portaobjetos, el exceso de agua se retira con papel filtro, la muestra debe aplanarse con otro portaobjetos y la preparación libre secarse al aire, una vez secada es fijada a la flama, la preparación se cubre con una solución de floxina al 1%, para despues calentarla a que desprenda vapores, pasados 15-20 minutos se lava con agua corriente, se deja secar al aire y se agrega la solución de tinción (56°C) y dejar secar por 75 minutos, la preparación se lava con agua, se seca y se observa al microscopio.

La solución de tinción consiste en cantidades iguales de anilina azul diluida, lactofenol, y aceite de clavo (especie), la dilución de anilina se prepara, mezclando una solución acuosa de anilina al 5% (solucion madre) en 75ml. de agua destilada, el lactofenol consiste en una parte de acido lactico 20 gr, cristales de fenol 20 gr y agua destilada 20ml., en dos partes de glicerina 40 gr, los hongos teñidos toman color rojo y su entorno azul claro

OTRAS MICOSIS INTERNAS

Existen otros hongos conocidos como patógenos de salmónidos, los mas importantes son: *Scolecobasidium humicola* observado en salmones confinados con fines experimentales. (*Oncorhynchus kisutch*)

Signos Clínicos de Importancia Diagnóstica

Los peces afectados muestran en general un abdomen aumentado de tamaño. además de lesiones en la piel, en otras ocasiones se observan ascitis, adherencias y zonas grisáceas en los órganos internos, especialmente riñón.

Procedimientos para el diagnóstico

Deben realizarse preparaciones semipermanentes (en fresco) a partir de las lesiones, estas se preparan con KOH al 4%, observandose al microscopio en los casos positivos hifas septadas, ramificadas., el cultivo en agar saboraud desarrolla colonias de color verde olivaceo con superficie pulverulenta, las colonias viejas son de color negro, con hifas aereas oscuras, las conidias son uniseptadas e individuales.

Phoma herbarum se detecto en 1975 causando enfermedad en tres especies de salmones (*O. kisutch*, *O. tshawytscha*, *S. gardneri*) en los estados de Oregon y Washington.

Signos Clínicos de Importancia Diagnóstica

Los peces afectados generalmente son alevines, presentan nado irregular con dificultad para mantener el equilibrio, presentan hinchazón anal con lesiones hemorrágicas en la piel y aletas. inicialmente las lesiones se limitan a la vejiga natatoria y consisten en pequeñas manchas blanquecinas de 1-2 mm, probablemente sea su conducto neumatico el primero que sufre la infección, en casos mas avanzados el lumen de la vejiga natatoria se llena de micelio.

Descripción del Hongo

Las colonias juvenes obtenidas en agar saboraud son de color rosa claro que cambian a un gris verdoso y hasta tomar un color negro formando un pycnidio, con conidias hialinas unicelulares.

ANEXO I

TECNICA DE TINCION DE GOMORI-GROCOT.

(metenamina argéntica y ac. crómico,GMS).

- 1.-desparafinizar los cortes y llevar a agua destilada. tratar los portaobjetos con colodión y colocar en alcohol de 95. (los frotis se preparan en portaobjetos tratados con albúmina y fijados con alcohol de 95).
- 2.-los cortes hidratados y los frotis se oxidan con ac. crómico al 5% durante una hora, se lavan despues en agua corriente por 10 minutos , para tratarse con bisulfito sodico un minuto con objeto de eliminar todo residuo de ac. crómico. a continuación se lavan de nuevo en agua corriente durante 5 minutos y finalmente en agua destilada por 3 veces seguidas.
- 3.-blanquear a 45 o 50 °c en una solución preparada por adición de 25ml. de nitrato de plata-metenamina a una porción igual de agua destilada que contenga de 1-2 ml. de borax al 5%. los hongos y la mucina empezaran a tenirse al cabo de 25-30 minutos debiendo observarse en este momento al microscopio. cuando la tinción es óptima los portaobjetos se lavan en agua destilada dos o tres veces.
- 4.-Tratar con cloruro de oro al 0.1% durante 5 minutos lo cual blanqueará también el fondo. enjuagar en agua destilada.
- 5.-Eliminar la plata no reducida por tratamiento con tiosulfato sódico al 2% durante 102 minutos, y despues lavar cuidadosamente, y contracolorar, si se considera necesario, con safranina si se desea tener de rojo los núcleos, o con una combinación de hematoxilina-eosina cuando se interesa poner de manifiesto los detalles en los tejidos..

REFERENCIAS

- Amos K.H.1985. Methods for the detection of certain mycotic diseases .third edition fish health section American Fisheries society.pp98-101.
- Ericson, J.D.(1965.) Report on the problem of *Ichthyosporidium* in rainbow trout. Progresive fish-culturist. 27: 179-184.
- Holland, M.(1971). *Saprolegnia* life cycle. Carolina tips 34:1-4.
- Lucky, Z. (1977). Methods for the diagnosis of fish diseases. ed. by Glenn L Hoffman. Fish and Wildlife service, U.S. Dept. of the interior and National Science foundation, Washington D.C. pp. 78-80.
- Neish, G.A.,and Huges (no date). fungal diseases of fishes. T.F.H. publications ,inc. Neptune city, New jersey.
- Post, G.(1983.) Textbook of Diseases fish, chapter V ed. T.F.H. N.J. pp73-83.
- Ross.A.J. and W.T. Yasutake.(1973.) *Scolecobasidium humicola* , a fungal pathogen of fish. J.fish res.bd.Can.30: 994-995.
- Yasutake,W.T.and S. Leek.(1975).*Phoma herbarum* ,a fungal plant saprophyte, as a fish pathogen.J.fish.res.bd.Can.32: 1648-1652.



