



## DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES PARASITARIAS

Feliciano Segovia Salinas y Fernando Jiménez Guzmán  
Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

### I. Metodos generales usados para Protozoarios:

Para la detección de Ectoparásitos (*Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* spp., *Ambiphrya*, *Epistylis* y *Chilodonella*) de diversas especies de trucha, se recomienda examinar piel y branquias con la ayuda del microscopio.

Para los endoparásitos (*Cryptobia*), que habitan sistemas, órganos y tejidos es indispensable revisarlos completamente para localizar las formas infectivas en sangre o localizar quistes, nódulos u otra forma parasitaria en el caso de microsporidios y myxosporidios.

La fijación de los flagelados ectoparásitos y endoparásitos es generalmente en alcohol y al formol sublimado, lavado en agua destilada y alcohol 70%, sumergida luego en solución alcohólica de yodo y finalmente teñida con hematoxilina férrica de Heidenhain's. Para los parásitos sanguíneos se puede utilizar la fijación en metanol y tinción con colorante Giemsa de 15 minutos a 1 hora, pasar al buffer de Giemsa, dejar secar, pasar a xileno y montar en resina sintética neutra.

Para ciliados como *Ichthyophthirius*, *Trichodina* y *Chilodonella* se usarán fijadores como el Schaudinn y líquido de Bouin y Zenker, para su posterior tinción con colorantes tricrómico, hematoxilina de la Field y Van Cleave; También se puede usar alcohol sublimado y tinción con hematoxilina de Heidenhain. Para una exacta identificación de las especies las preparaciones son impregnadas en plata según las técnicas de Klein's y Foissner (1992).

Para microsporidios y myxosporidios se usarán como fijador el metanol y se teñirán las muestras en colorante Wrigth, Giemsa o solución acuosa de azul de metileno, Feulgen o Giemsa-Mac Grunwald.

### II. Enfermedad del torneo (*Myxobolus cerebralis*)

La enfermedad del torneo es referido algunas veces como una infección crónica no contagiosa de la trucha y otras especies de la familia salmonidae. El parásito tiene un tropismo específico por cartilago. Si la infección es alta y ataca peces juveniles, generalmente ocurren mortalidades severas. Los peces muestran un comportamiento anormal en su nado y melanismo notorio de la aleta y pedunculo caudal, los cuales son signos de la "cola negra". Cuando el parásito ha tenido suficiente tiempo para desarrollarse, la cabeza y el esqueleto axial comienzan a desfigurarse. Este parásito pertenece a un grupo de protozoarios conocido como myxosporidios. Se encontró por vez primera en Europa hace más de cien años, y su ciclo vital se descubrió hace aproximadamente 10 años.

**Diagnosis:** La enfermedad del torneo puede ser diagnosticada clínicamente en base a su apariencia y cambios de su comportamiento. Los peces no comen y algunos individuos muestran el torneo a lo largo de todo el cuerpo. El pedunculo empieza a oscurecerse. Los órganos internos son normales, en cortes histológicos en cartilago muestran daños como lisis.

Si la infección tiene 3 o más meses, se notan las esporas pequeñas, biconvexa, en forma de disco, típicas de *Myxobolus cerebralis*. Las técnicas de rutina usadas en histología son: la de hematoxilina y eosina, Giemsa, May-Grunwald-Giemsa y Ziehl Neelsen, las cuales tiñen bien las cápsulas polares.

**Identificación:** Como en muchas especies de myxosporidios, las esporas de *Myxobolus cerebralis* no son fáciles de distinguir y aún resulta más difícil la identificación morfológica por una persona sin experiencia en el campo de la protozoología. La espora madura es circular, lenticular, biconvexa; mide de 8 a 10 micras de diámetro, tienen dos cápsulas polares ovales, conteniendo filamentos polares en el extremo de la espora. Se deberá tomar en cuenta la localización anatómica de las esporas, localización geográfica, historia clínica del centro acuícola, especies de peces afectadas y signos clínicos del pez. Además es importante en la identificación tamaño y forma de la espora, datos de epizootiología y serología. En serología es usada la técnica de anticuerpos fluorescentes (Markiw & Wolf, 1978). Antisuero de conejo contra *M. cerebralis* es conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Este compuesto químico reacciona con esporas y presporas y la reacción puede ser observada con un microscopio de fluorescencia, preferentemente con sistema de epifluorescencia.

**Detección:** Se basa en la observación de las esporas maduras. Cuantitativamente las 2/3 partes de todas las esporas están en la cabeza y más de la mitad de ellas en el cartilago y arcos branquiales (Markiw & Wolf 1974). La ausencia o presencia de las esporas es determinada con algunos métodos. El más sencillo consiste en remover los arcos branquiales y suspender la mezcla homogénea en varios volúmenes de agua o solución salina fisiológica, centrifugar por varios minutos y tomar varias gotas del sobrenadante y examinar al microscopio en 10X, 20X o 40X. Si no encuentra esporas después de investigar 5 o 10 minutos, porciones de la muestra deberán ser examinadas.

Si no se encontraron esporas en el primer procedimiento de muestreo, se deberá usar otro método, como el método de centrifugación con plancton (Prasher et al. 1971; O'Grodnick, 1975) el cual recomienda que las cabezas de los peces sean puestas en agua a 50 grados centígrados por 5-10 minutos, luego son pasados a una centrifuga de plancton. Una modificación de la técnica anterior es la de Markiw & Wolf 1980 los cuales usan digestión en tripsina 0.25% a un pH 7.2-7.5 para remover los residuos de tejidos. El método más sensible para la detección de esporas es el de Markiw & Wolf, 1974 el cual involucra digestión en pepsina, tripsina y dextrosa.

**Distribución geográfica y de hospederos:** La enfermedad del torneo ocurre en Europa, Islas Británicas, Nueva Zelanda y Estados Unidos de Norteamérica., Sudafrica, Inglaterra.

Esta enfermedad ocurre típicamente en especies de la familia salmonidae, principalmente en poblaciones de peces cultivados y aún en silvestres. Los investigadores opinan que esta enfermedad es muy importante en *Oncorhynchus mykiss* (*Salmo gairdneri*) y que la "trucha café" *Salmo trutta* es la más resistente (Halliday 1976; Hoffman & Putz 1969; O'Grodnick 1979). Las especies con susceptibilidad intermedia son *Oncorhynchus kisutch*, *O. nerka*, *Salvelinus fontinalis*, *Coregonus* sp y *Prosopium* sp.

**Inmunidad:** La respuesta inmune de los peces a la enfermedad del torneo es poca, además de que se desconoce la respuesta del hospedero intermediario: *Tubifex tubifex*.

**Ciclo vital:** Consiste de dos fases. La primera involucra la infección del pez por un actinosporidio maduro llamado *Triactinomyxon gyrosalmo* el cual es liberado del vector *Tubifex tubifex*. La trucha infectada desarrolla la cola negra y muestra el cuerpo torcido a los 1-1.5 meses. A los 4 meses se completa el desarrollo de la forma circular de *Myxobolus cerebralis* en el pez. Luego las esporas son liberadas de los peces infectados al morir éstos o

son ingeridas por un predator. Dentro de pocos días las esporas pueden ser comidas por gusanos oligoquetos y la nueva fase de *Triactinomyxon* se desarrolla en el estómago. Posteriormente es comido el oligoqueto o es liberado la forma libre del parásito, la cual penetra a la trucha por las lamelas branquiales, donde el triactinomyxon transfiere numerosos trofozoitos en el sistema vascular del pez. Una vez en el pez las esporas de *M. cerebralis* maduran después de los tres meses. La incubación está directamente relacionada con la temperatura. Las crías de trucha que comen gusanos infectados o son expuestas al triactinomyxon libre muestran los signos de la cola negra después de los 35 a 45 días a 12 grados centígrados. Las esporas maduras pueden notarse a los 2-4 meses, pero la producción de esporas continúa por semanas o meses. El tiempo de incubación en el gusano es definido como el intervalo entre el primer contacto de *M. cerebralis* y la liberación del primer *Triactinomyxon*.

### III. Ceratomyxosis en salmonidos (*Ceratomyxa shasta*)

La ceratomyxosis es una enfermedad de peces salmonidos causado por el myxosporidio histozoico *Ceratomyxa shasta*. Este parásito fue reportado por primera vez en 1948 en trucha "arco iris" *Salmo gairdneri* en el condado de Shasta, California (Wales & Wolf 1955) y fue descrito como nueva especie por Noble (1950). El ciclo vital de este organismo es poco conocido. *C. shasta* es un myxosporidio de importancia porque ataca peces juveniles en piscifactoris y peces silvestres y probablemente contribuya en las mortalidades en la migración de salmones adultos.

**Rango geográfico y de hospederos:** USA, particularmente Oregon, Washington, California, Columbia Británica, Idaho.

Los hospederos infectados son peces marinos y de agua dulce entre ellos: *Oncorhynchus kisutch*, *O. tshawytscha*, *O. nerka*, *O. keta*, *Salmo gairdneri*, *S. clarkii*, y *S. trutta*, *S. salar* y *Salvelinus fontinalis*. Un aspecto importante acerca de la distribución de *C. shasta* es su confinamiento en salmonidos de la costa del Pacífico. Este parásito no ha sido reportado fuera de ahí en los últimos 30 años. Esta distribución restringida es diferente al notado en otros patógenos, que tienen una distribución amplia en otras localidades. Semejante especificidad ecológica es compatible con la idea de que algún factor específico como algunos vectores requerido para provocar la infección en salmonidos en esa área.

**Diagnóstico:** En los juveniles de trucha el desarrollo de los trofozoitos, presporas y esporas de *C. shasta* es retardado cuando las temperaturas del agua son menores a 10°C. Por encima de esta temperatura los signos notados en las truchas son los siguientes: En peces juveniles los signos externos son falta de apetito, exoftalmia, abdomen distendido. Los signos internos en peces juveniles son áreas hemorrágicas en el intestino, presencia de fluido ascítico. También pueden ser infectados en el tracto alimentario, hígado, vejiga natatoria, bazo, hígado riñones, corazón y branquias.

En los adultos existen áreas hemorrágicas en intestino y peritonitis. Presentan nódulos en el estómago los cuales se pueden perforar y el pez morir. El sistema muscular puede presentar abscesos de gran tamaño.

**Patogenicidad:** A los 17°C se inicia la infección en los ciegos pilóricos. A los 13 días siguientes el parásito se disemina dentro de la mucosa del intestino y pasa a todo el tracto alimenticio, para finalmente provocar la muerte. Hay inflamación de la lamina propia, necrosis del músculo y edema. A los tres días después de la exposición a la espora ocurren cambios

histológicos donde los trofozoitos o estadios infectivos de la espora invaden ciegos pilóricos y recto.

**Identificación:** Se basa en la forma y dimensiones de la espora. Puede hacer frotis, secar al aire, fijar en metanol y teñir con Giemsa o Ziehl Nelsen. Los trofozoitos tienen un endoplasma granular y vejiga natatoria. Las esporas de *Ceratomyxa shasta* son bicapsuladas con los extremos ampliamente redondeados y las valvas de la pared de la espora son arqueadas a diferencia del género *Myxidium* donde son continuas.

3) Preparaciones permanentes pueden ser obtenidas de frotis fijados en Schaudinn y luego teñidos con Hematóxilina de Heidenhain's.

El examen de peces vivos incluye la obtención de esporas del contenido intestinal con una jeringa de vidrio de 10 cc. Se harán frotis del material concentrado y se teñirá con Ziehl-Nielsen. Para detectar infecciones asintomáticas se deberán usar los procedimientos usados para la enfermedad del torneo.

**Efectos de la temperatura:** La ceratomyxosis se desarrolla en poblaciones de salmonidos únicamente cuando los peces son expuestos en aguas que tienen el estadio infectivo del parásito a temperaturas que exceden los 10°C.

**Susceptibilidad y resistencia:** Se ha observado que *Salmo clarkii* es la especie más susceptible y que *Salmo trutta* y *Salvelinus fontinalis* son las menos susceptibles.

**Modo de transmisión y ocurrencia estacional:** La transmisión natural ocurre cuando los salmonidos entran en contacto con agua conteniendo estadios infectivos. La exposición por un período de 30 minutos es suficiente para iniciar la enfermedad. Aparentemente el modo de transmisión no es directa o sea de pez a pez. Se ha notado que el estadio infectivo es destruido a temperaturas de 50 grados C por 30 min.

La infectividad y epizootias están usualmente limitadas a períodos cuando el agua está caliente, principalmente en primavera.

#### MÉTODOS ESPECÍFICOS DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DEL TORNEO

Método de digestión pepsina-tripsina-dextrosa (Markiw & Wolf, 1974).

- A) Colecta de los peces**
- B) Remoción de cartilago y tejido en agua caliente (45-50°) por 5-10 minutos.** Los arcos branquiales son extraídos intactos y son guardados. El esqueleto es seccionado en piezas de 3-5 mm. Checar una muestra para ver si existen esporas. Si es negativo el diagnóstico pasar al paso C.
- C) Digestión en pepsina:** fragmentos de esqueleto son picados, y pasados a digestión en pepsina preparada 0.5% a pH 1.8-1.85 en solución de ácido clorhídrico 0.5%. Un volumen de 25-30 ml de pepsina es usada por cada gramo de fragmento esquelético. La digestión se lleva a cabo en matraces erlenmeyer por un lapso de 1-3 horas. Tire el líquido sobrenadante.

En peces juveniles con una hora de digestión es suficiente.

- D) Digestión en tripsina:** La segunda digestión se hará en tripsina al 0.5% disuelta en solución Tyrode's, calcio y magnesio según Rinaldini (1959). La tripsina es filtrada en papel Watman # 114. Los sedimentos obtenidos de la pepsina son mezclados con volúmenes iguales de solución

tripsina para dar una concentración final de 0.25%. El pH inicial se ajustará a 8.0-8.5 con NaOH 1N. La digestión se hará a 22°C por 30 minutos, agitando suavemente. La digestión en tripsina fue neutralizada añadiéndole suero fetal de bovino a una concentración final del 20%. El material digerido es filtrado a través de una gasa y centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 22°C. El pellet obtenido es resuspendido en 20-25 volúmenes de solución de Hank's conteniendo suero fetal de bovino al 20%.

**10-12 Purificación, aislamiento y concentración:** 5 ml. del pellet digerido en tripsina fueron puestos dentro de 3 ml. de solución dextrosa acuosa al 55% contenida en un tubo de centrifuga conico o para cuantificación dentro de un mililitro de dextrosa en 6.5 ml de un tubo albumina de Sheuky-Stafford. Ambos deberán ser centrifugados a 1200 rpm por 30 min a 22°C. Resuspender el pellet en 2-4 volúmenes de agua y examinar microscópicamente la presencia de esporas. La cuantificación de esporas si la muestra es positiva se hará en un hemocitometro de Neubauer y se deberá cuantificar por tetraplicado en 0.4mm<sup>3</sup>. Solo esporas típicas son contadas (2 cápsulas polares de igual tamaño).

#### MATERIAL Y REACTIVOS USADOS EN LA TECNICA PEPSINA-TRIPSINA-DEXTROSA

- Albumina bívina 10%, fracción V.
- albumina bovina 10g
- agua destilada 100 ml

Guardar en el refrigerador en pequeñas cantidades.

- Solución pepsina 0.5%, pH 1.8-1.85 en HCL 0.5%.
- pepsina 5g
- HCL concentrado 5ml.
- agua destilada 1000ml

- Solución de tripsina 0.5%
- tripsina 5g
- sol'n de Rinaldini's 200ml.
- agua destilada 1000ml

Guardar en el refrigerador en pequeñas cantidades

- Solución Hank's conteniendo suero de albumina bovina 1%.
- Hank's en polvo 500mg
- Suero albumina bovina 10g
- Agua destilada 1000ml

ajustar a pH 7.0-7.2 con NaOH 0.1N

- Guardar en el refrigerador en pequeñas cantidades
- Solución de Rinaldini's
- NaCl 20g
- KCl 0.5g
- Citrato de sodio 2.5g
- Carbonato ácido de sodio 2.5g
- Rojo fenol 0.5% 10ml
- Glucosa 2.5g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.125g
- Agua destilada 500ml.

Guardar en el refrigerador en pequeñas cantidades.

Dextrosa 55%  
dextrosa 55g  
Agua destilada caliente 100ml  
Guardar en el refrigerador en pequeñas cantidades. Añada varias gotas de cloroformo para inhibir crecimiento de mohos durante el almacenamiento.

### Otras myxosporidiasis en salmónidos

#### Parvicapsulosis

El agente etiológico de ésta enfermedad es *Parvicapsula* sp.; las especies afectadas *Oncorhynchus tshawytscha*, *O. kisutch*, *O. masu*, *Salmo salar*, *S. clarkii*. Los signos clínicos incluyen letargo, pérdida de apetito. El diagnóstico se basa en la necropsia de riñón posterior.

Las esporas de *Parvicapsula* sp. miden 9 um de largo por 6 um de ancho y puede observarse al microscopio en preparaciones permanentes del riñón posterior. Las cápsulas polares se tiñen positivamente con el colorante Giemsa.

Este protozooario es común encontrarlo en salmones del Pacífico. Se conoce poco del ciclo vital. El estadio vegetativo o trofozoito se desarrolla sistemicamente y con esporula en peitelio tubular renal con ruptura y liberación de esporas infectivas dentro de los túbulos.

El efecto en el hospedero incluye ruptura mecánica de los tubos renales, hemorragia y edema, los cuales pueden ocasionar mortalidades altas en piscifactorías de la trucha. Las prevalencias más altas se producen durante los meses de primavera.

Esta enfermedad ha sido encontrada en Washington y Oregon, U.S.A. Se utilizará la técnica usada para Myxoboliasis y ceratomyxosis para peces asintomáticos.

#### Chloromyxosis

Es ocasionada por el myxosporeo *Chloromyxum trutta*. Estos organismos atacan vejiga natatoria y sistema excretor. En esos órganos forman plasmodios esporogónicos pequeños. Miden de 5-11 um. El diagnóstico se basa en la observación de esporas que tienen cuatro capsulas polares en el extremo anterior de la espóra y presentan pliegues a través de toda la espóra. Se deberán hacer preparaciones en fresco, fijar en formol 10% o Bovin, realizar cortes histológicos y teñirlos con Giemsa y Hematoxolina y Eosina. Los peces presentan pérdida de apetito y de peso, la vejiga natatoria e hígado tienen inflamación. El ciclo vital indica que las esporas maduras entran en el intestino por la bilis. Las esporas son descartadas en las heces dentro del agua y las esporas son tomadas nuevamente por un nuevo hospedero.. Se cono poco acerca de la epizootiología de esta enfermedad. Entre los hospederos de *Ch. truttae* estan la trucha arco iris europea *Salmo gairdneri*, la trucha americana *Salvelinus*., *S. trutta* y *S. irideus*. Segun investigadores rusos, la enfermedad aparece unicamente en los peces a finales de otono y principios de invierno. La distribución geografica abarca piscifactorias de la región de Leningrado, Europa y USA.

#### Myxidiasis (*Myxidium oviforme*, *M. truttae*)

Son esporas fusiformes con los extremos punteados ó redondeados con dos cápsulas polares en ambos extremos; celozoido ó histozoico. *Myxidium truttae* tiene como habitat la vejiga natatoria y como hospederos a *trutta* y *Coregonus ussuriensis*. La distribución geografica abarca Corea, Rusia, Europa y USA. El estadio vegetativo es desconocido. Las esporas tienen una línea sutural en forma de S la cual es usada para su diagnóstico. Miden de 10-12 micras de largo por 5-7 micras de ancho. *Myxidium oviforme* tiene como hospederos a *Salmo salar*, *S. trutta*, *S. irideus*, *Oncorhynchus keta*, *O. gorbuscha*, *O. nerka* y *Salvelinus alpinus*. Las esporas miden de 10-13 micras de largo X 7-9 de ancho de la espóra. Para diagnóstico, ver (Enfermedad del Torneo).

#### Pleistoforiasis (*Pleistophora salmonae*)

Esta enfermedad es ocasionada por organismos formadores de esporas llamados microsporidios. El agente causal se denomina *Pleistophora salmonis*. Tienen un filamento polar y generalmente se forman mas de 12 esporontes dentro de un trofozoito. Los quistes son pequeños y habitan branquias de la trucha arco iris *Salmo gairdneri*. a diferencia de otras especies como *P. ocariae* que ataca ovarios, hígado y riñón de *Notemigonus crysoleucas* y *P. cepedianae* que ataca visceras de *Dorosoma cepedianum*. Estos parásitos miden de 3-6 micras de diametro. Son parásitos obligados de las células branquiales donde se reproducen por división asexual (esquizogonia) y fusión (esporogonia dentro de cada célula, donde producen tumores o xenomas. La identificación microscopica de este género de microsporidio deberá incluir la observación de los quistes blanquecinos en branquias o los xenomas. La identificación microscópica incluye la disección de xenomas pequeños para ver al microscopio la presencia de esporas. Es importante observar la presencia de membranas que recubren a las esporas (pansporoblastos) los cuales tienen un número de esporas por esporonte con cubierta (pansporoblasto). Por ejemplo *Nosema* produce una espóra por esporonte, *Glugea*, dos esporas por esporonte, *Thelohania* ocho esporas y *Pleistophora* 16 o más esporas por esporonte. Se deberá guardar las muestras en formol 10% para histología convencional y glutaraldehido 2-4% para estudio de microscopia electrónica, los cuales seran necesarios para notar el polaroplasto, esporoplasma, núcleos y número de vueltas del filamento polar, este último característica necesaria para la diferenciación a especie. No se conoce su ciclo vital, pero algunos investigadores (Awakura, 1969) piensan que existe un hospedero intermediario (rotíferos), para el microsporidio. *Pleistophora* causa serias epizootias en piscifactorias y en el medios silvestres. Wales y Wolf (1955) reportan a *Pleistophora* (probablemente *P. salmonae*) en branquias de *Salmo gairdneri*, *Oncorhynchus nerka* y *Cottus* sp.; ellos mencionan este parásito ocasiono la pérdida de 170,000 crias de trucha en el Norte de California y otro caso similar sucedió en Columbia Británica, donde hubo mortalidades de hasta un 75%.

#### Hexamitiasis

##### (*Hexamita salmonis*)

Ataca intestino de truchas jóvenes *Salvelinus fontinalis*., y *Salmo trutta*. Tiene forma piriforme, 2 núcleos cerca del extremo anterior, 6 flagelados anteriores y 2 posteriores; 2 axostilos; forma quistes. Los signos clínicos son debilidad general, pérdida de peso. Principalmente se presenta en los meses de primavera y verano. Las infecciones severas causan que las truchas permanezcan en el fondo de los estanques en estado de letargo. El diagnóstico se basa en la observación de los signos clínicos e identificación del organismo.