



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
ICHTHYOPHONUS HOFERI
EN PECES DE IMPORTANCIA COMERCIAL DEL
NORESTE DE MEXICO**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA.**

PRESENTA

Q.B.P. JUAN MANUEL ADAME RODRIGUEZ.

SAN NICOLAS DE LOS GARZA NUEVO LEON. ENERO 1993

FM
SH171
A3
C.1

22



1080073248

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Ichthyophonus hoferi* EN PECES DE
IMPORTANCIA COMERCIAL DEL NORESTE DE MEXICO.**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA.**

PRESENTA

Q.B.P JUAN MANUEL ADAME RODRIGUEZ.

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON. ENERO 1993

TM
SH171
A3

Biblioteca Central Magda
UANL
FONDO
TESIS

BURAU RANGEL FINES
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

(73248)

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Ichthyophonus hoferi*
EN PECES DE IMPORTANCIA COMERCIAL EN EL NORESTE DE MEXICO

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN PARASITOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P JUAN MANUEL ADAME RODRIGUEZ

COMISION DE TESIS



M.en C. FERNANDO JIMÉNEZ GUZMAN
PRESIDENTE



DR. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS
SECRETARIO



M.en C. FRANCISCO JAVIER IRUEGAS BUENTELLO.
VOCAL.

DEDICATORIA

A dios nuestro Señor por TODO lo que me ha dado en esta vida .

A mis padres JUAN MANUEL Y EDILIA a quienes nunca podré corresponder el haberme dado la vida.

A mi esposa LYDIA GUADALUPE por tu comprensión y apoyo en todo momento.

A mis queridos hijos quienes son motivación de mi vida LYDIA MARCELA, JUAN MANUEL Y MELISSA GUADALUPE.

A mis hermanos LAURA ESTHER, MARTHA ALICIA, LUIS GERARDO, DORA EDILIA, Y FRANCISCO JAVIER.con el cariño y respeto que nuestros padres nos enseñaron.

A los QBP. REYES S TAMEZ GUERRA, LUIS J GALAN WONG Y FILIBERTO DE LA GARZA ORTIZ por su amistad y su constante lucha para la superación de nuestra carrera.

A TODOS AQUELLOS QUE SIENTEN AMISTAD POR MI LE DEDICO MI TRABAJO.

AGRADECIMIENTOS

Al Biol. M.C. FERNANDO JIMENEZ GUZMAN el haberme apoyado, con sus conocimientos y gran calidad humana en esta etapa de mi vida profesional.

Al Q.B.P. M.C. FRANCISCO JAVIER IRUEGAS BUENTELLO sus atinados consejos, siempre impulsados por su espíritu crítico.

Al Q.B.P. DR. ILDEFONSO FERNANDEZ SALAS su actitud siempre motivante y positiva, por su apoyo logístico para la escritura del presente trabajo.

Al QFB. ENRIQUE RAMIREZ BON su colaboración en la parte técnica de microscopía electrónica, para la cual sus conocimientos y su experiencia han sido determinante.

Al Q.B.P. M.C. LUCIO GALAVIZ SILVA por sus comentarios y su amplia disposición para la redacción de este trabajo.

Al LIC. JOSE LUIS GIBAJA sus consejos y disposición para la producción de los aspectos gráficos .

A todos los miembros del LABORATORIO DE PARASITOLOGIA EDUARDO CABALLERO Y CABALLERO."

Al DR. DAVID A CONROY por sus conceptos sobre la parte micológica del presente trabajo.

A los integrantes del LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA MEDICA por su franco y desinteresado compañerismo.

INDICE GENERAL

	PAG.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	17
DISCUSION	24
CONCLUSION	29
RESUMEN	32
LITERATURA CITADA	33
ANEXO DE FIGURAS	38

INDICE DE FOTOGRAFIAS

- 1.- Cultivo de *Ichthyophonus hoferi* en su fase primaria
- 2.-Embrion ameboide binucleado.(escala 10 um).
- 3.-Formas esféricas uninucleadas.(escala 10 um).
- 4.-Formas esféricas multinucleadas.(escala 10 um)
- 5.-Filamentium. (escala 10 um).
- 6.-Celulas amorfas en proceso de germinación.(escala 10 um).
- 7.-Cuerpos esféricos multinucleados de pared gruesa.(escala 20 um).
- 8.-Cultivo de *I. hoferi* fase secundaria o micelial.
- 9.y 10.-Formación de esporangios.(escala. 10 um Y 20um).
- 11.- Esporangios diferenciados.(escala. 10 um).
- 12.-Ameboblasto (escala 20 um).
- 13.-Plasmodio con embriones ameboides.(escala. 10 um).

- 14.-Micelio cenocítico en microcultivo.(escala 20um).
- 15.-Esporangios en microcultivo.(escala 20 um).
- 16.- Formas fúngicas en tejido.(escala. 20 um).
- 17.-Ameboplastos en cortes histológicos de branquias.(esc.20um).
- 18.-Formas fúngicas en cortes histológicos de riñon. (escala100um).
- 19.-Formas fungicas en cortes histológicos de hígado. (escala50um).
- 20.-Formas gemantes en tejido conectivo de branquias. (esc100um).
- 21 y 23.-Ultraestructura de la hifa corte transversal.(escala.2.8um). Pm: plasmalema, M: macrovesículas, Mi: mitocondrias. E.R.: reticulo endoplasmico.
- 22.-Ultraestructura de la hifa corte longitudinal inicio del crecimiento.(escala 1.6um). Mv: microvesículas, E.R: reticulo endoplasmico, Pm: plasmalema.
- 24.-Ultraestructura corte longitudinal de la hifa.(escala 6.6um).N: núcleos.
- 25.-Acuarios del bioensayo.
- 26.-Cultivo de *Artemia salina* en el laboratorio.

27 y 28.-Peces del bioensayo que desarrollaron signos de enfermedad (lesiones y nado en espiral).(escala 2cm).

29.- Forma multigemante en cerebro del pez con nado en espiral.(esc.10 um).

30 y 31.-Cortes histológicos de riñon de los peces enfermos (bioensayo esc. 20 um y 40 um respectivamente.).

INDICE DE MAPAS

	PAG.
1.- mapa N° 1 Piscifactoría "La Rosa". Gral. Cepeda, Coahuila.	12
2.- mapa N° 2 Piscifactoría " Salinillas". Anahuac, Nuevo León. Y Centro Acuícola "Vicente Guerrero, Abasolo. Tamaulipas.	13

INDICE DE GRAFICAS

1.-Gráfica N° 1 Peces positivos por mes.	18
2.-Gráfica N°2 Porcentajes de infección	19

INTRODUCCION

La acuicultura como fuente productora de alimentos para el consumo humano en el mundo actualmente recibe un gran impulso. Esto se debe a que en sus dos facetas tanto intensiva y extensiva proporciona alternativas viables en apoyo a la producción de alimentos a costos relativamente bajos. En ambos casos la calidad de los ejemplares cultivados queda sujeta en gran medida a la sanidad que el sistema de cultivo presenta. En el caso de un cultivo de peces se requiere el control de enfermedades tales como: deficiencias nutricionales, infecciones por virus, bacterias y hongos, presencia de parásitos, o la acción de ectoparasitos. Cada una de los agentes antes mencionadas representa riesgos diferentes para el cultivo y por lo mismo su importancia queda en función de cada caso en particular. Las micosis como enfermedades de peces se conocen desde el año 1882 por Huxley y se presentan como infecciones que pueden ser superficiales o sistémicas, las primeras son causadas por hongos acuáticos los cuales son saprófitos y su forma de infección es mas bien oportunista, en cambio en el caso de la ictiofoniasis, la más importante micosis sistémica el agente causal *Ichthyophonus hoferi* es un parásito obligado, aunque es posible cultivarlo *in vitro*.

El hongo *Ichthyophonus hoferi* Plehn & Mulsow, 1911, es el agente etiológico de la ictiofoniasis, se presenta en peces marinos, euryalinos y dulceacuícolas Post (1983) lo reporta en 73 especies de hospederos susceptibles para esta enfermedad, manifestándose por la presencia de lesiones superficiales de tipo granulomatoso, principalmente en la región lateroventral del pez, lo cual confiere este el efecto de papel de lija al tacto, además de nado errático y tambaleante. En órganos internos como lamelas branquiales, riñon, hígado, cerebro, etc, causa disfunción, además de nado errático y tambaleante, ya que es

una enfermedad con carácter sistémico, que se adquiere por vía oral al ingerir restos de peces con el hongo.

Los primeros datos sobre *I. hoferi* surgen en 1893, cuando Bruno Hofer reporta la enfermedad del "tambaleo". Posteriormente en 1911, Plehn & Mulsow describieron el agente causal, sucediéndose desde entonces innumerables descripciones que abarcaron distintas fases de desarrollo y controversias en relación con su taxonomía (Neresheimer & Clodi 1914, Sproston 1944, Sprague 1965, Schaperclaus 1954 y Sinderman & Scatergood 1954). Debido a que *I. hoferi* presenta un complejo ciclo biológico con desarrollo de micelio cenocítico, esporangios, formas ameboides, plasmodios y formas de transición entre su reproducción filamentosa, plasmodial y parenquimatosa, ubicándolo indistintamente en los ficomicetos (Van Duijn.1967), Zygomycetos (Reichenbach-Klinke 1982) y Entomophthorales (Sproston 1944 y Okamoto *et al.* 1987). Formas similares a este hongo han sido descritas por Reichenbach-Klinke en anfibios (1973).

El carácter sistémico de la ictiofoniasis, su capacidad para permanecer latente por largos períodos y el comportamiento eurixénico del hongo, justifican su importancia en sanidad acuícola, pues incluso ha sido reportado como causante de epizootias en peces de cultivo y silvestres de la costa este de los Estados Unidos de Norteamérica con una mortalidad del 25.0 % (Wolke1975).

En nuestro país, *I. hoferi* no se considera dentro de los riesgos a asegurar(Boletín de Acuicultura 1987); incluso no existen reportes de su presencia en peces silvestres o sujetos a cultivo. probablemente debido a la falta de investigadores en sanidad piscícola, la cual cobra cada día más auge con el incremento de las granjas acuícolas. Así como también debido a las ventajas biogeográficas que ofrece nuestro territorio al situarse en una zona de transición neártica-neotropical lo cual también facilita la adaptación de los organismos

patógenos de clima frío a huéspedes de clima tropical (Beaver, 1986), lo que es muy posible que suceda en el caso particular de *I. hoferi*. Dichas adaptaciones de patógenos se ven fomentadas por el escaso y algunas veces hasta nulo control sanitario en el traslado de peces de las granjas acuícolas dentro del territorio mexicano, e incluso en la introducción de peces silvestres a los centros de producción. Es muy importante establecer que no existe aún tratamiento alguno para el control de la ictiofonirosis, en los casos positivos se recomienda la destrucción por incineración de los peces infectados aún sean estos asintomáticos, ya que estos pueden permanecer por largos períodos en calidad de portadores.

Bajo este panorama hemos trazado como objetivos determinar la presencia de *I. hoferi* en peces cultivados de las granjas piscícolas del noreste de México, describir sus formas de desarrollo en condiciones de cultivo y comprobar el carácter patógeno del hongo aislado.

ANTECEDENTES

En 1893 Bruno Hofer al estudiar una nueva enfermedad en salmónidos encuentra dentro de la mayoría de los órganos muestreados, principalmente en el corazón, riñón y hígado, unos quistes pequeños de color blanquecino de como cabeza de alfiler. Específicamente en "trucha café" *Salmo trutta* y "trucha brook" *Salvelinus fontinalis* , ambas cultivadas en Alemania, además de la platija *Platichthys flesus*, que presentaban nado errático (basculante) .Por lo cual le denominó "enfermedad del tambaleo" ("Taumelkrankheit") por a los problemas de la locomoción que en los peces puede ocasionar y a la forma que presenta al inicio de la evolución de los quistes los cuales dejan escapar una masa citoplásmica. Sin establecer nombre alguno para el agente causal, a el que solo describe como una gregarina en su manual de enfermedades de peces Handbuch Der Taumelkrankheit.(Hofer 1904).

Caullery y Mesnil (1905) describen una enfermedad similar a la reportada por Hofer, pero atribuyeron esta etiología a un parásito de el estómago y ciegos pilóricos del pez *Motella mustella* L. , protozooario que pertenece a el grupo de los haplosporidios, *Ichthyosporidium gasterophilum*. de el cual se apunta su morfología este parásito posteriormente se ha reconocido como sinónimo de *I hoferi*.

Plehn y Mulsow (1911). En Alemania, describen en forma detallada la relación existente entre la enfermedad y la naturaleza micótica del agente etiológico de la ictiofoniasis en trucha arco iris *Salmo gairdneri* .

Neresheimer y Clodi (1914). describen la presencia de *Ichthyophonus hoferi* en hígado y corazón especialmente en peces de agua dulce. Ellos aportan una importante contribución al conocimiento del parásito tendiente a elucidar su evolución., Después de haber disectado y separado los órganos de una gran cantidad de truchas infectadas, observaron la germinación de quistes dentro del estomago, la cual se efectuó por liberación de un plasmodio que se fragmenta después, o por emisión de filamentos, así como Plehn y Mulsow lo habían señalado en 1911, uno y otro proceso conducen a la formación de pequeñas esferas plurinucleadas de 10 a 20 μm de diametro que se aplican contra la mucosa de la región pilórica y penetran al interior de ella. También encuentran que entre 24 y 72 horas después de recibir la infección por via oral, los cuerpos ameboides en migración atraviesan la membrana mucosa y la submucosa de el estómago, para ganar los vasos sanguíneos y linfáticos. Pero mas tarde de 36 a 72 horas encontraron en vasos sanguíneos como, unos corpuscúlos redondos de 5 a 10 μm muy parecidos a los leucocitos, considerandolos como *I. hoferi*, los estadios mas jovenes que ellos observan dentro de los tejidos (6-20 μm de diametro) tienen de 5-12 núcleos. El crecimiento del hongo se sucede después rapidamente, a los 14 dias, algunos quistes llegan a medir 100 μm de diametro.

Daniel (1933). Reporta en arenques (*Clupea harengus*) un nuevo tipo de germinación filamentosa dentro del cual el citoplasma interior del filamento se divide en masas globulosas (quistes secundarios o esporas ?), generalmente multinucleados, pero en ocasiones también uni o binucleados semejantes a quistes de tamaño uniforme capaces de reproducirse por multiplicación de núcleos. Posteriormente describe la anatomía de las lesiones en forma macroscópica y microscópica producidas por el mismo hongo *I. hoferi* . Así como la invasión de los órganos por el parásito y la reacción de los tejidos por la presencia de quistes, lo cual concuerda con lo reportado en salmónidos por Plehn and Mulsow(1911). En los arenques los nódulos que resultan de los depósitos de esferas en las capas conectivas que rodean a el parásito, terminan por necrosarse o por formar pequeños

abcesos, los más superficiales pueden abrir al exterior y permitir la liberación de quistes responsables de formación de ulceraciones y de manchas negras sobre la piel de los peces.

Sproston (1944) en Inglaterra, observó la presencia de hifas, conidioforos ramificados, conidios, endoconidios, y clamidosporas de *Ichthyophonus hoferi* en macarela (*Scomber sp.*). Describiendo a la vez un mas complejo ciclo de vida, este es el unico estudio en el cual se presentan evidencias de reproducción sexual, en forma de las fusiones hifales. Además, estima que las formas que el parásito puede presentar en su desarrollo se deben a la naturaleza del hospedero, también lo ubica entre los Entomophtorales y establece que su nombre correcto es *Ichthyosporidium hoferi* (Plehn y Mulsow).

Scatergood (1948) reporta la presencia de el hongo *Ichthyosporidium hoferi* en forma de brotes epizooticos en arenques (*Clupea harengus*) del Atlántico norte. Describiendo además una sencilla secuencia historica de estadios de vida, involucrando germinación múltiple de esporas de pared gruesa, invasión de tejidos del hospedero, formación de cuerpos hifales y germinación secuencial de esas entidades, asi como tambien establece períodos de siete a diez años entre cada epizootia, que ocurren con mayor frecuencia cuando la temperatura del agua baja durante el invierno y la primavera.

Rucker y Gustafson (1953) reportan una epizootia causada por *Ichthyophonus hoferi* en trucha arcoiris *Salmo gairdneri*, como un patógeno introducido en piscifactorias del oeste de los Estados Unidos de Norteamérica (Estado de Washington). Además, establecen que este hongo muy raramente se presenta en el cerebro de la trucha arcoiris.

Shaperclaus en 1953, estima que existen dos formas de *Ichthyophonus hoferi*, una para salmónidos y otra para peces de acuario estableciendo diferencias para cada uno de ellas, considerando típico de la primera forma : la ausencia de inclusiones negras en el parásito,

presencia de proliferaciones germinativas, intensa infección de las branquias y mas rara vez de la piel; en la segunda forma: inclusiones negras, desprendimiento de esférulas hijas, y frecuentes lesiones ulcerativas en la piel.

Gustafson y Rucker (1956) publican un estudio sobre *Ichthyophonus hoferi*, su forma de infección en peces, transmisión y rango de hospederos (especificidad). Asi mismo inducen la enfermedad por tres procedimientos: inoculación por via parenteral, por via oral a través de alimentos contaminados e indirectamente por contacto con peces contaminados. Se probaron nueve especies diferentes de peces, trucha arcoiris *Salmo gairdneri*, salmón plateado *Oncorhynchus kisutch*, salmón sockeye *Oncorhynchus nerka*, Squawfish *Ptychocheilus oregonensis* salmón chinook *Oncorhynchus tshawytscha*, cotoid *Cotus asper*, pez dorado (goldfish) *Carassius auratus*, guppy *Lebistes reticulatus*, bagre de canal *Ictalurus punctatus*. La trucha arcoiris fué la especie mas suceptible a la enfermedad, ya que por los tres mecanismos se desarrolló el estado de portador, en valores por encima de el 50%. Con resultados negativos para el bagre, el pez plateado, guppys y squawfish.

Dorier y Degrange (1961), publican un estudio completo acerca de la evolución de *Ichthyosporidium hoferi* en salmónidos; en el integran su ciclo biológico después de confirmar los trabajos publicados por otros autores. En su propuesta incluyen tres formas de reproducción; filamentosa, plasmodial y parenquimatosa. De la primera establece dos modos, una que se da en los sujetos vivos (*in vivo*), semejante a la que ya antes habia descrito Daniel (1934) en arenques, y otra en los peces muertos (*post mortem*); también proponen que los quistes son rodeados de una cubierta externa, muy delgada y de naturaleza quitinosa. Las inclusiones del citoplasma son constituidas por lípidos y glucógeno. Dentro de los núcleos en reposo, la cromatina esta dispuesta en un anillo que rodea la superficie del cariosoma indicando que la primer reacción del organismo ante el parásito se manifiesta por una fagocitosis intensa que aparece pasadas las 48 horas, asi los

quistes pueden ser eliminados al medio ambiente por branquias y mucosa del aparato digestivo.

Erickson (1965) reporta la infecciones epizooticas de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) causadas por *Ichthyophonus hoferi* en piscifactorias de Idaho menciona que en los Estados Unidos de Norteamerica no se han tenido reportes anteriores sobre la curvatura de la espina dorsal en truchas causadas por este hongo. Al realizar cortes de tejido cerebral y otras viceras, observó una aparente relación entre *I. hoferi* y la curvatura de la espina dorsal. Las esferas(cuerpos esféricos multinucleares) reemplazan mucho tejido cerebral causando presión y daño sobre los nervios motores los cuales gobiernan la musculatura miomerica, sin embargo, la ausencia de vertebras anormales en los estudios con rayos X indican que la curvatura no es resultado de un problema del sistema esquelético. Otro aspecto de su trabajo establece que la infección por *I. hoferi* afecta el desarrollo de los peces en su talla y peso, experimentalmente seleccionaron 80 truchas arcoiris, todas de nueve pulgadas de largo, de ellos 40 habian tenido contacto con el agente etiológico, posteriormente se eligieron al azar diez peces del grupo de 80, que se anestesiaron, se pesaron y se midieron, estos 10 peces se alimentaron por 44 dias con alimento peletizado a razón de 1.9 % de su peso corporal, y se sacrificaron. Al comparar las tallas y pesos entre los peces sanos y los enfermos observó que los sanos superaban a los enfermos en talla y peso por un 50% como mínimo.

Hendricks (1972) publica un trabajo fundamentado en aspectos histológicos, presentando lesiones en el riñon y formas enquistadas asociadas a proceso inflamatorio, por la presencia de *I. hoferi* en dos nuevas especies de peces marinos, *Moxocephalus octodecemspinus* ("longhorn sculpin") y *Gadus morhua* bacalao del golfo de Maine. U.S.A.

Okamoto *et al.* (1985) realizan un estudio en el cual presentan una variedad de formas de *Ichthyophonus hoferi*, las cuales incluyen ameboblastos, cuerpos amebiodes, cuerpos plasmodiales, cuerpos esféricos uni y binucleados, cuerpos esféricos multinucleados de pared delgada, cuerpos hifales esféricos multinucleados cultivadas *in vitro*, las cuales coinciden muchas de ellas con el ciclo de vida propuesto por Dorier y Degrange (1961). En este ciclo se reproduce el hongo en condiciones diversas de cultivo, variando el potencial de hidrógeno del medio, así como el medio de cultivo mismo (MEM-10 y TGC caldo tioglicolato), el desarrollo de *I. hoferi* se logra en caldo tioglicolato, así como en medio mínimo esencial enriquecidos ambos con suero fetal de ternera al 1%. Además, presentaron el único trabajo existente sobre ultraestructura del agente causal de la ictiofoniasis. En el plantearon una breve descripción morfológica en la cual se observó la presencia de tres capas distintas en la pared celular de los cuerpos esféricos de pared delgada, mientras que las capas media y externa aparecen muy delgadas o ausentes en los cuerpos esféricos multinucleados terminales. La estructura de la pared celular de los cuerpos esféricos multinucleados es similar a la de las hifas tanto, los cuerpos esféricos de pared delgada como los terminales hifales, desarrollan el ciclo de crecimiento ordinario cuando son transferidos a un diferente medio de cultivo.

Okamoto *et al* (1987) inducen en forma experimental la infección de truchas arcoiris *Salmo gairdneri*, con cuerpos esféricos multinucleados de pared delgada de *Ichthyophonus hoferi* obtenidos de cultivos *in vitro*. Para lo cual utilizaron dos medios de cultivo diferentes, caldo tioglicolato (TGC-1) y medio mínimo esencial (MEM-10), ambos enriquecidos con suero de útero de bovino al 1% y al 10% respectivamente. Se incubaron a 20°C por 37 días, a un rango de PH de 7-9, en el primer medio se obtuvieron cuerpos esféricos de pared delgada y en el segundo se logró obtener la forma micelial con cuerpos esféricos terminales. Se inocularon oralmente, tres lotes con 20 alevines de trucha arcoiris cada uno, el primero se alimentó con cuerpos esféricos multinucleados de pared delgada

suspendidos en solución salina, el segundo con la forma micelial también en solución salina y el lote control con solución salina y alimento. En este trabajo se concluyó que los cuerpos esféricos de pared delgada representan la forma más infectiva del hongo, ya que los alevines a los que se les administró estas formas fue el único lote en el cual hubo mortalidad hasta del 90% a los 24 días post-infección y el 10% restante presentó el hongo.

Sitja y Alvarez, en 1990, reportaron la ictiofonirosis en el pez *Dicentrarchus labrax*. Establecen la prevalencia e intensidad de la infección. Al examinar 228 peces, de ellos 101 silvestres y 127 de cultivo por medio de preparaciones semipermanentes y técnicas histológicas. Los cuales presentaban una prevalencia del 14% para la población de vida silvestre y un 24% para los cultivados. En el caso de los peces silvestres se observaron variaciones estacionales que siguen un patrón bimodal con una máxima en Primavera, Otoño (y un marcado pico en Noviembre); y un mínimo (0%) en Verano. En el caso de los peces cultivados las variaciones estacionales son más irregulares, pero si observamos la distribución bimodal su máxima intensidad se presenta cuando la temperatura se encuentra entre 11 y 16 °C y el mínimo ocurre a los 28 °C. Además, observan que la distribución anual de la mayor prevalencia de la infección se presenta en los meses de Noviembre, Diciembre, Enero y Febrero, disminuyendo a 0% durante Julio, Agosto.

Waterhouse (1973). incluye a *I. hoferi* en la lista de hongos que pertenecen a el orden Entomophthorales, de la clase Zigomycetes, subdivisión Zigomycotina, división Eumicota, reino Fungi, sin mencionar familia. esta clasificación taxonómica se fundamenta en criterios morfológicos, si bien *I. hoferi* no se ajusta totalmente a las familias ya descritas para este orden si presenta las características morfológicas a nivel de orden.

MATERIAL y METODOS

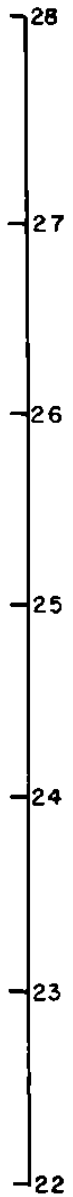
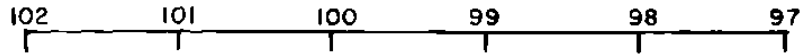
AREA DE ESTUDIO

Los peces para el presente estudio fueron colectados al azar, en estanques rusticos de tres centros Acuícolas del Noreste de México: Centro Acuícola "Vicente Guerrero" en el municipio de Abasolo, Tamaulipas (24° 03' 30" Latitud Norte, 98° 32' 30" Longitud oeste), Centro Acuícola "La Rosa" mpio. de Gral. Cepeda Coahuila (25° 26' 04" L.N., 107° 23' 17" L.O.) y Piscifactoría "Salinillas" Anahuac Nuevo Leon. (27° 26' 04" L.N., 100° 22' 08" L.O.) (Secretaría de programación y presupuesto, Dirección General de Geografía del Territorio Nacional. 1981). (mapas 1 y 2).

Colecta de Peces

La colecta de hospederos se llevo a cabo en forma aleatoria durante los meses de Febrero a Diciembre de 1987. Se capturó un ejemplar por mes de cada uno de los tres estanques rústicos seleccionados al azar para cada piscifactoría lo cual implica especies diferentes en cada localidad. De acuerdo a los 11 meses en que se efectuó el muestreo, fueron analizados 33 peces de cada localidad. En la piscifactoría "Vicente Guerrero" Abasolo Tamaulipas se colectó robalo *Micropterus salmoides*; en el centro acuícola "La Rosa" Gral. Cepeda Coahuila se colectó mojarra del género *Tilapia sp*; en la piscifactoría "Salinillas" Anahuac Nuevo León se colectó bagre de canal *Ictalurus punctatus*.

LONGITUD



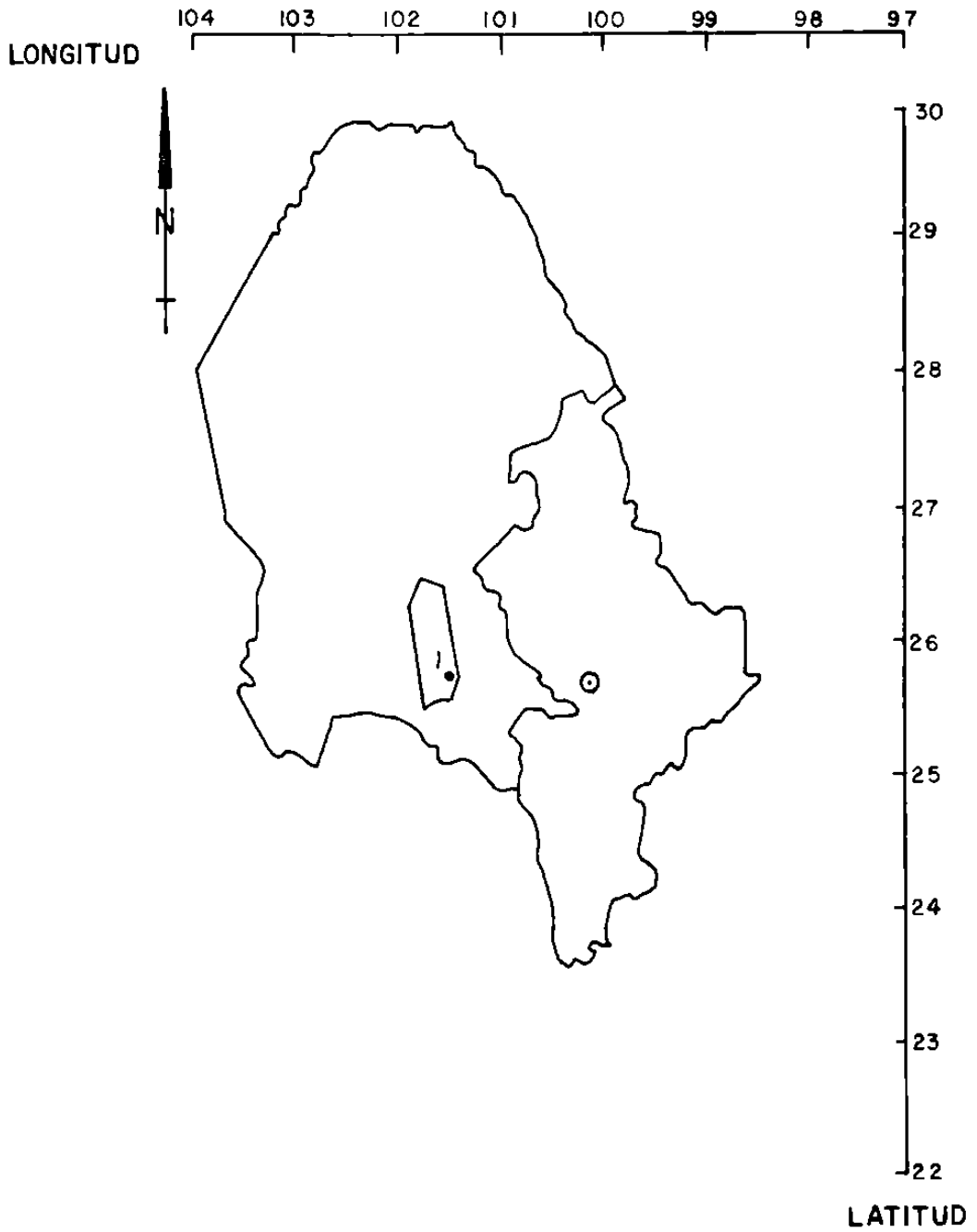
Ø-P. SALINILLAS

O-C. A. VICENTE GUERRERO

LATITUD

PUNTO DE COLECTA

MAPA - 2



MAPA-I

CENTRO ACUICOLA "LA ROSA"

Los peces muestreados se trasladaron al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, donde se les practicó disección bajo la metodología siguiente: fueron sacrificados por punción craneal o por electroshock (Jimenez *et al* 1986).. Posteriormente se procedió a separar laminas branquiales; por incisión ventral se disecaron órganos internos para su revisión macroscópica. Una vez separado cada órgano se dividió en tres partes la primera para realizar montajes en fresco, la segunda para efectuar el cultivo del hongo y la tercera porción se utilizó para el estudio histológico para lo cual se usaron técnicas convencionales Los montajes en fresco se prepararon depositando una gota de solución de hidroxido de potasio al 4%, además de una película delgada de tejido entre portaobjetos y cubreobjetos. De esta forma se facilita la observación del hongo al aclararse el tejido por efecto del KOH (Koneman1988).

CULTIVOS

Los cultivos se realizaron inoculando una porción del tejido en botellas de cultivo con 20 ml de agar micocel enriquecido con suero fetal de ternera al 1% e incubando a 9 °C de temperatura (Post 1983). Además se cultivo este hongo en medio de Peptona extracto de levadura y glucosa, el cual es un medio adecuado para inducir la producción de zoosporas (Bailey *et al* 1990), lo anterior aunque no se ha reportado nos es útil con fines taxonómicos. A partir de los cultivos positivos se prepararon microcultivos por la técnica recomendada por Koneman y Roberts (1988). Esta consiste en depositar pequeños trozos de agar(1cm de diametro) sobre un portaobjetos, el agar se inoculó con el hongo cultivado y se coloca un cubreobjetos en la parte superior incubandose a 18 °C por un período de tres a cuatro dias para conseguir el desarrollo tanto del micelio de sustrato (absortivo), como el aéreo (reproductivo).

HISTOLOGIA

La muestra para el proceso histológico se fijó en formol al 10% por separado cada órgano por 24 hrs posteriormente se deshidrató cada muestra utilizando series de alcoholes del 80%- al absoluto, xilol y se incluyó este material en parafinas I, II, III de 56^o-58^oC. Una vez realizados los cortes por medio de microtomo se montaron sobre un portaobjetos, cada uno de ellos se sometió a un proceso de desparafinización y se hidrataron en agua destilada, enseguida se procedió a aplicar las tecnicas de tinción de hematoxilina y eosina(Luna 1968), además de la técnica de acido peryódico de Schiff. (McManus 1948).

ULTRAESTRUCTURA

Para la realizacion de observaciones de ultraestructura se preparó un cultivo de *I. hoferi*. Este se inoculó en un medio de caldo Saboraud enriquecido con suero fetal de ternera al 1%, incubandolo a temperatura ambiente con agitación continua a 120 rpm, con el objetivo de obtener solamente la fase micelial del hongo (Emerson 1950). Posteriormente se fijó en glutaraldehido al 2.5% por 48 hrs.y como segunda fijación en tetraoxido de osmio al 1% por 3 horas, enseguida se infiltró en resina epoxi (oxido de propileno), de la cual se practicaron cortes semifinos y finos teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo (Clinton 1988), se observaron para localizar los apices de las hifas, ya que estas presentan una forma de crecimiento apical, sitio en donde se encuentra el complejo vesicular apical que puede presentar alguno de los tres modelos propuestos por Grove y Bracker (1983) para fines taxonómicos.

BIOENSAYOS

Se realizó un bioensayo con el objetivo de probar la patogenicidad de los hongos aislados y la posible infección de peces en forma indirecta, el modelo utilizado se fundamenta en el publicado por Okamoto y cols.(1987), modificado de acuerdo con los objetivos del presente trabajo y es el siguiente: se prepararon 5 lotes de 5 peces de la especie *Ictalurus punctatus* con una talla de dos pulgadas cada pez. Cada lote se colocó en acuarios separados, todos previamente se mantuvieron en cuarentena por un lapso de 60 días. Se inocularon por vía oral los lotes #1 y el #2 , el #1 con una suspensión con micelio solamente, el #2 se inoculó con micelio mas esporangios. Los lotes #3 y #4 se inocularon a través de alimento vivo (vehículo), para esto en el laboratorio se estableció un cultivo de *Artemia salina*, la cual se puso en contacto con suspensiones de micelio para alimentar a los peces del lote #3. De la misma forma, pero utilizando micelio mas esporas se alimentó el lote # 4. El quinto lote quedó en calidad de testigo.

RESULTADOS

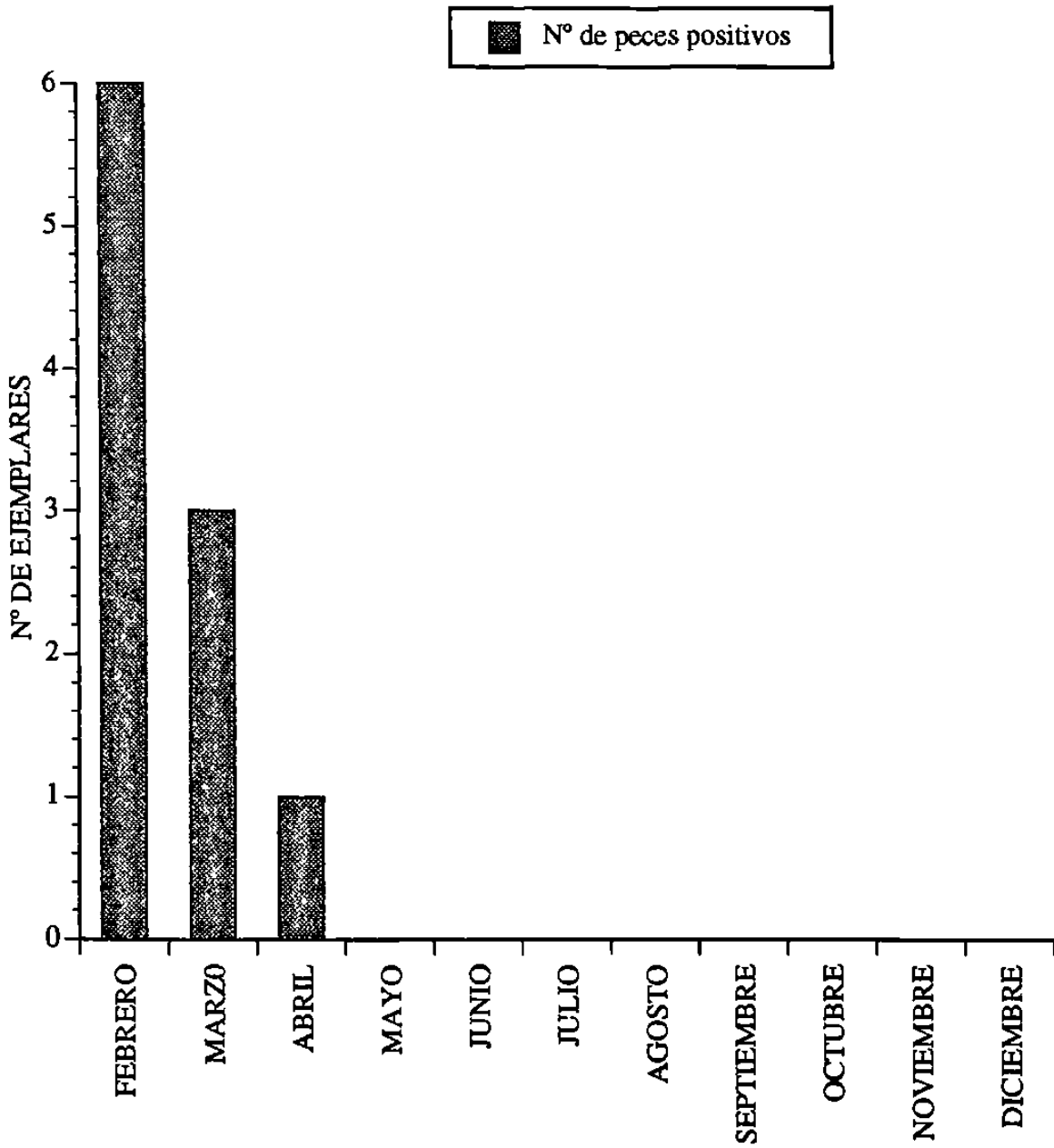
PREVALENCIA Y DINAMICA ESTACIONAL

De acuerdo a los muestreos efectuados, *I. hoferi* fué aislado solo en el período de tiempo comprendido en los meses de Febrero, Marzo y Abril, esto fué en tres ejemplares de mojarra *Tilapia sp* .capturadas en Gral. Cepeda, Coahuila y de siete robalos *Micropterus salmoides* provenientes de Abasolo, Tamaulipas. En el municipio de Anáhuac, Nuevo León el hongo no fué detectado durante el periodo de estudio en los 33 bagres de canal (*Ictalurus punctatus*) estudiados.(gráfica 1).

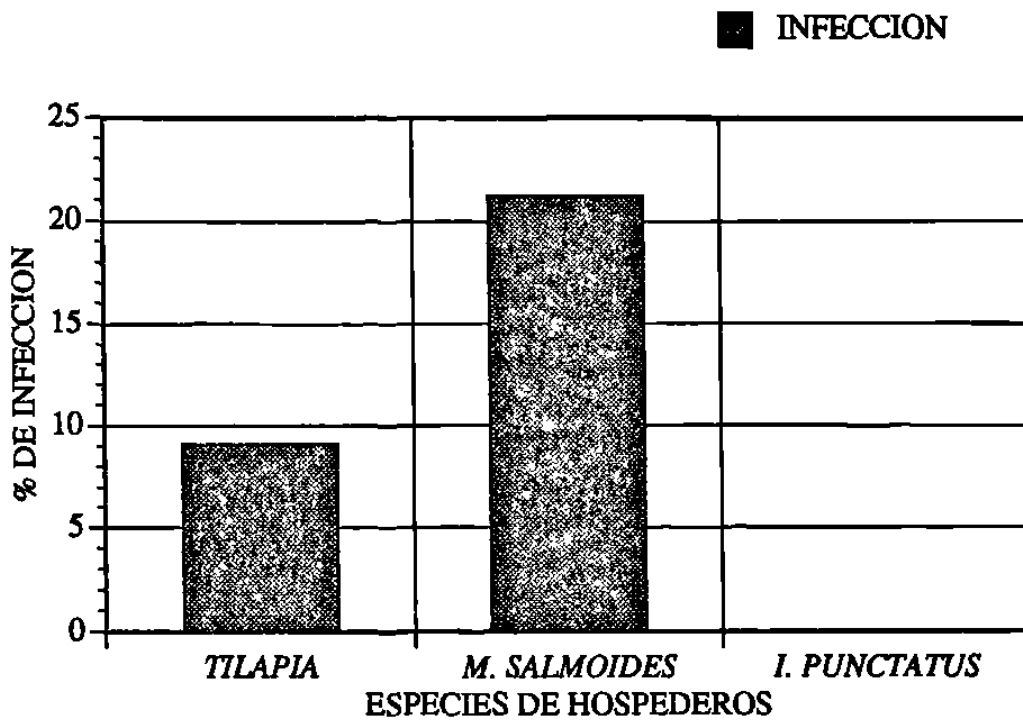
En base al muestreo realizado, la prevalencia que se obtuvo para los peces de General Cepeda, fué de 9.09 % (3/33) y 21.21% (7/33) para los peces de Abasolo, Tamaulipas. (gráfica 2).

CULTIVO

El criterio que nos permite confirmar la presencia de *I.hoferi* en los peces analizados es, en primer lugar, el crecimiento obtenido en el medio Micocel, que consiste en colonias de color blanco, de consistencia mucosida (foto.1), las cuales mediante exámen microscópico en preparaciones húmedas con azul de algodón, presentan formas ameboides uni y binucleadas (7.5 um, foto. 3). En las revisiones microscópicas posteriores estas formas incrementan su tamaño y se tornan esféricas (11.3 um, foto 4) con el citoplasma caracterizado por



GRAFICA 1. N°DE PECES POSITIVOS POR MES



GRAFICA-. 2. PORCENTAJES DE INFECCION POR ESPECIES

poseer un acúmulo de formas multinucleadas (foto 5). Durante esta misma fase del cultivo, se observó el filamentum (56.8 um de longitud, foto. 6) Además se observaron células amorfas en proceso de germinación (64.4 um de longitud, foto. 7) y una gran cantidad de cuerpos esféricos multinucleados de pared gruesa (10.0-14.0 um de diámetro, (foto.8). Al 28° día de incubación el cultivo se tornó pardo y de consistencia filamentosa (foto.2). En esta fase, bajo examen microscópico se observaron esporangios en proceso de diferenciación citoplasmática, desarrollándose una gran cantidad de ameboblastos. Los esporangios (25.0-60.0 um, fotos. 9-11) se presentaron unidos a hifas robustas de 10.0 a 12.0 um de grosor y una vez separadas del esporangioforo estos permanecen como cuerpos esféricos multinucleados de pared delgada (foto.12). En esta fase también fué posible detectar plasmodios con ameboblastos en su interior de 42.0 um de largo (foto.13). El cultivo para la inducción de formación de zoosporas resultó positivo ya que se desarrolló micelio, pero fué negativo para la formación de esporas flageladas.

MICROCULTIVO

El carácter cenocítico y el crecimiento apical que presenta el micelio de *I. hoferi*, fué posible detectarlo en los microcultivos con cuatro días de incubación con medidas de 8 a 10 um de grosor, así como también la formación de esporangios que van de 10 a 30 um de diámetro en el micelio aéreo (fotos.14 y 15).

HISTOLOGIA

En las preparaciones semipermanentes (en fresco) se observó frecuentemente en las diferentes especies de hospederos que resultaron positivos, la presencia de estructuras fúngicas de forma ovoide con un extremo alargado que termina en una punta, esta además

permite observar una doble membrana que la rodea, así como una notoria melanización (92um foto. 16).

En los cortes histológicos realizados a partir de los peces que resultaron positivos se procesaron por las técnicas de tinción de hematoxilina y eosina, se dificultó la identificación de formas fúngicas inmersas en el tejido las muestras procesadas que procedían de branquias, hígado, bazo y riñón, como parte de la metodología a seguir se realizó además la técnica de tinción del ácido peryódico de Schiff (PAS), en este caso se procesaron muestras de branquias, hígado y riñón (fotos. 17 18um, 18 35um y 19 21um), el contraste de coloración que esta técnica proporciona entre las estructuras fúngicas y el tejido de cada órgano facilitó la observación de las células micóticas como en el caso de las formas gemantes en el tejido conectivo de las branquias (foto. 20 47um), así como también las formas fúngicas que presentan una alta vacuolización observadas entre los filamentos branquiales tanto de robalo (*Micropterus salmoides*) como de mojarra (*Tilapia sp*).

ULTRAESTRUCTURA

En relación a el estudio de ultraestructura se realizaron cortes y se observaron a diferentes ampliaciones, a partir de un cultivo en fase micelial con 5 días de incubación a temperatura ambiente y en agitación continua a 120 rpm. En ellos se observó la presencia de tres capas en la pared celular tanto en cortes transversales como en longitudinales, la más interna se identificó como el plasmalema (Pm .083um), además se observó la fusión de macrovesículas con el mismo, mecanismo que le sirve a la célula para el incremento de la pared como parte de el proceso de crecimiento (foto. 21), en este estudio además se reconocieron estructuras como microvesículas (Mv 0.14um) las cuales probablemente sean chitosomas en el ápice de la hifa, elementos de retículo endoplasmico (ER hasta 3.8um.) y núcleos (N 0.85um) (foto. 22), se identificaron también organelos tales como

mitocondrias(Mi 0.83um), así como también un red de microfibrillas en el apice y macrovesículas(M 0.33um) fusionandose con el plasmalema(Pm) (foto. 23), en un corte longitudinal de la hifa se observan algunos núcleos y la pared celular formadas por tres capas (foto. 24 0.41um). Es importante mencionar que en los cortes realizados no esta presente el "Spitzenkörper" que observan Grove y Bracker 1987 establecen como característicos para hongos de micelio septado.

BIOENSAYOS

En los bioensayos que se efectuaron siguiendo el modelo establecido en la metodología (foto. 25 y 26), se utilizaron crias seleccionadas de bagre de canal (*I. punctatus*) de dos pulgadas de talla en promedio, sin que estos presentaron signos de enfermedad. El primer lote (5 ejemplares) se inoculó via oral con 1 ml de suspensión de micelio mas esporas de *I. hoferi*, de este lote solo dos peces presentaron alteraciones después de tres semanas, uno desarrolló lesiones superficiales en su aleta dorsal (fotos. 27 y 28) y el otro se comportó con nado en espiral. El segundo lote se inoculó via oral con 1 ml de una suspensión de micelio exclusivamente, después de cinco semanas los peces del ensayo no mostraron cambios. El tercer lote de peces se alimentó con 30 ejemplares vivos de *A. salina* los cuales previamente se pusieron en contacto con una suspensión de micelio mas esporas de *I. hoferi* por un lapso de treinta minutos previos a la inoculación, en este caso también pasadas cinco semanas se suspendio la observación al no presentar cambios los peces. En el cuarto lote utilizando *A. salina* en condiciones similares a el tercer lote pero con una suspensión de micelio unicamente los resultados fueron similares. Como testigo del bioensayo se manejo un lote para el control el cual se mantuvo sin que los peces mostraran algún cambio durante la duración del mismo.

A partir de los peces que presentaron alteraciones se confirmó la presencia de *I. hoferi* ya que este se aisló en cultivo, además, que por medio de técnicas histoquímicas (tinción de PAS) se observó diferentes formas del hongo en cortes de rífon (foto. 30 60um y 31 22um) y del pez con nado en espiral, por medio de improntas de cerebro se observaron células fúngicas con gemación múltiple (foto 29 8um).

DISCUSION

PREVALENCIA Y DINAMICA ESTACIONAL

Se presenta el primer trabajo relacionado con enfermedades micóticas en peces de México y en especial se establece la presencia de *I. hoferi* en las tres piscifactorías muestreadas del noreste del país, donde no existen antecedentes sobre la presencia de este hongo, por lo que es importante su identificación al no contar con medios para su control sanitario, especialmente cuando se trata del traslado de peces y se disemina a otros centros acuícolas. De acuerdo a nuestros resultados, la prevalencia asciende a 9.09% para la *Tilapia* y 21.21% para *Micropterus salmoides* y de 0% para *Ictalurus punctatus* pero aún son necesarias más contribuciones al respecto para determinar su distribución en el resto del país y por lo tanto su verdadera importancia sanitaria.

En el estudio publicado por Sitja y Alvarez en 1990, ellos toman como muestra un total de 127 peces cultivados de una sola especie (*Dicentrarchus labrax*), de los cuales un 24% de prevalencia para *I hoferi*. La estacionalidad depende de la temperatura, entre 11 y 16 ° C de temperatura se observaron los valores máximos y a los 28 ° C los mínimos. En nuestro trabajo se revisaron 99 peces en total divididos en 3 especies diferentes *M. salmoides*, *Tilapia sp.*, y *I. punctatus* para una prevalencia de 21.21%, 9.09%, y 0%, respectivamente, para un total acumulado de 30.30 %. En relación a la estacionalidad en nuestro estudio los meses en los cuales obtuvimos resultados positivos fueron: en orden decreciente Enero (6), Febrero (3) y Marzo (1), en los cuales la temperatura del agua se ubicó entre los 16 y los 18 °C.

CULTIVOS:

En relación a la temperatura y período de incubación de los cultivos *in vitro*, Roberts (1981) establece 10 °C como la temperatura óptima y de 7-10 días para obtener el crecimiento en medio de agar glucosa Saboraud enriquecido con suero de bovino al 1%. En nuestro trabajo el crecimiento lo obtuvimos en dos etapas: una a los 10 días y la segunda a los 28 días a 9 °C de temperatura en medio de agar selectivo para hongos patógenos enriquecido con suero fetal de ternera al 1%. Estas modificaciones se realizaron a fin de ampliar el conocimiento sobre el cultivo de este hongo. La temperatura de 9 °C resulto ser apropiada, mientras que el suero fetal de ternera, por su contenido en concentración y diversidad hormonal (Hy Clone Lab.,Inc. 1988) es un inductor de transformación morfológica en hongos (Gamez 1991), además el uso de un medio de cultivo selectivo con cloramfenicol y cicloheximida elimina bacterias contaminantes y hongos saprófitos, respectivamente (Bioxon 1991). observamos que *I. hoferi* presenta micelio cenocítico y formación de esporangios, esto se logró por medio de un microcultivo, técnica de la cual no existe antecedentes registrados en micología de peces.

Okamoto (1986) utiliza el medio mínimo esencial (MEM 10) enriquecido con suero fetal de ternera al 10 % para inducir diversas formas de *I. hoferi in vitro* a la vez que modifica el PH, con lo cual concordamos en nuestro trabajo y a la vez observamos que el medio de cultivo no es determinante para las transformaciones fúngicas como lo es el suero fetal de ternera ya, que nosotros utilizamos medio de Micocel con el mismo resultado. La inducción de las diferentes formas fúngicas en las dos etapas de cultivo son reguladas por el PH y las hormonas esteroidales, ámbos factores contenidos en el suero fetal de ternera, el primero se modifica de acuerdo con el crecimiento del hongo como consecuencia del agotamiento del medio de cultivo y el segundo participa como inductor de transformación morfológica(Gámez 1991).

La merística de todas las formas observadas (citadas a continuación entre paréntesis) concuerda con los datos aportados en este aspecto por Dorier & Degrange (1961), el cual tomamos como referencia comparativa. Estos autores observan los embriones ameboides de 6.7-8.5um (7.5um, foto. 2); formas esféricas uninucleadas ó "quistes juvenes" con 8.5-13.3um (11.3um, foto. 3) de diámetro; hifas cortas irregulares estriadas a las cuales Post (1983) refiere como filamentum, ambas referencias sin aportar medidas (56.8um de largo, foto. 5); estructuras de germinación plasmodial (las cuales en la foto. 6 se citan como estructura celular amorfa de 64.4um) de pared gruesa, con un proceso de diferenciación citoplásmica en su interior para la formación de endosporas y las formas esféricas multinucleadas de 10.0-14.0um (12.0-17.0um, foto. 7) de diámetro. Los esporangios observados en la segunda etapa, con diámetro de 26.0-60.0 y hasta 75.8um en el punto de mayor diferenciación citoplásmica en diferentes grados de desarrollo (foto. 9 y 10), se describen por Dorier & Degrange (1961) como la germinación filamentosa *post mortem* , sin mencionar merística.

HISTOLOGIA

Según Roberts (1981) la fase de "reposo" o fase de espora es la que se observa con mas frecuencia. La espora en general tiene forma esférica u oval, con un diámetro de 10-250um y presenta una doble pared, con resultado positivo a la tinción de PAS. En cortes histológicos se observan las esporas en germinación con un alargamiento citoplásmico limitado por la membrana interior de la espora. Wolke (1975) menciona que el citoplasma de la espora esta muchas veces vacuolizado y contiene numerosos núcleos. En nuestro trabajo, tanto en los tejidos procedentes de los peces muestreados, como también en los de los peces del bioensayo observamos estructuras de forma ovoide, las cuales responden positivamente a la tinción de PAS ya que adquieren un color carmín, y además muestran

una pared doble. Con relación a la merística de estas formas presenta rangos muy amplios ya que las observamos hasta en 300x. Nuestras observaciones incluyen cortes de riñón e hígado, en cortes de branquias observamos formas fúngicas con una gran vacuolización en tejido conectivo. En las improntas realizadas con tejido cerebral de los peces con signos de enfermedad resultados del bioensayo observamos esporas en proceso de germinación múltiple con la limitada por la membrana interna de la célula. Las formas fúngicas observadas por nosotros no difieren de las reportadas por los autores mencionados. Las lesiones que observamos en el riñón de robalo son similares a las reportadas por Hendricks 1972.

ULTRAESTRUCTURA

El trabajo publicado por Okamoto *et al* en 1985, incluye información sobre ultraestructura de *I. hoferi*, en el se establece la presencia de 3 capas bien definidas que componen la pared celular en los cuerpos esféricos de pared delgada, mientras que en los cuerpos esféricos multinucleares terminales las capas media o externa aparecen muy delgadas o ausentes. Además, menciona que la estructura de la pared celular de los cuerpos esféricos multinucleados es similar a la de las hifas. En nuestros resultados observamos también la pared celular integrada por 3 capas, tanto en cortes transversales, así como en los longitudinales de las hifas, la capa más interna se reconoce como plasmalema (Cole 1986). Además se observan mitocondrias y una red de microfibrillas en el ápice de la hifa, es notoria la ausencia de el "Spitzenkörper" descrito por Grove y Bracker en 1987 en Deuteromicetos, Ascomicetos y Basidiomicetos.

BIOENSAYOS

En relación a este punto es importante establecer que solo existe un trabajo publicado por Okamoto *et al*, en el cual se induce la enfermedad en condiciones de cultivo, este data de 1987. En el se realizó la infección por vía oral de trucha arcoiris *Salmo gairdneri* con un cultivo de *I. hoferi*. Ellos determinaron que la forma infectiva de este hongo son los cuerpos esféricos multinucleados de pared delgada al observar un 100% de infección y un 90% de mortalidad a los 25 días postinfección a una temperatura de 16 °C. Además observaron signos de enfermedad tales como obscurecimiento de la piel, perforación en la superficie del cuerpo, y nódulos blancos en algunos órganos internos. En nuestro experimento los peces mostraron nado en espiral, así como también, lesiones superficiales, formas fungicas en improntas de cerebro, y en riñón.

CONCLUSION

CULTIVOS

De acuerdo a las formas observadas, su morfología, los aspectos fisiológicos del hongo, su temperatura óptima de desarrollo, el periodo de tiempo de incubación, sus requerimientos nutricionales y el origen de las muestras, las formas aisladas se identifican como *Ichthyophonus hoferi* reportándose por primera ocasión en peces dulceacuícolas del noreste de México. Con esto se amplía su distribución, pues el ámbito geográfico conocido comprende la región del Atlántico norte, en aguas alrededor de Japón, Golfo de México y Sudafrica (Sitja & Alvarez en 1990).

ULTRAESTRUCTURA

En relación con la ultraestructura del hongo se confirma el crecimiento apical previamente observado en el microcultivo, ya que se observan evidencias de la fusión de macrovesículas con el plasmalema fenómeno descrito por Cole en 1986. Se confirma también el carácter cenocítico de las hifas a través de este estudio, considerando la ausencia del "Spitzenkörper" en nuestras fotografías y tomando como marco de referencia los trabajos de Grove y Bracker 1987 podemos establecer que *I. hoferi* no pertenece a las clases Basidiomicetes, Ascomicetes o Deuteromicetes. Por lo tanto, queda abierta la posibilidad de que este hongo se ubique dentro de la clase de los Zigomicetos o en la división Mastigomycota, pero esta última posibilidad queda descartada debido a que *I. hoferi* no presenta producción de zoosporas (esporas flageladas) en su ciclo de vida (Dorier y Degrange, 1961. Okamoto *et al*, 1985) y lo confirmamos cuando lo cultivamos en medio de P Y G. con resultados

negativos, este medio es adecuado para inducción de zoosporas. Por otra parte confirmamos la presencia de una pared celular integrada por tres capas, en la fase micelial (Okamoto *et al* 1985).

HISTOLOGIA

Los cortes histológicos procesados por la técnica de tinción de hematoxilina y eosina, no resultaron ser muy útiles para la identificación de *I. hoferi* debido a la morfología y dimensiones que este presenta. En cambio al utilizar la tinción de PAS (ácido peryodico de Schiff) se logró identificar con facilidad a este hongo mas que nada por la contrastante coloración que esta técnica proporciona tanto a los tejidos (café) como al hongo (carmin) que los invade, se observó formas del hongo con una alta vacuolización lo cual es característico de las formas ameboides, estas anteriormente fueron observadas por Okamoto *et al* en 1987, además observamos lesiones en riñon de *M salmoides* estas son muy similares a las descritas en riñon de bacalao por Hendricks en 1972. (foto. 18).

BIOENSAYO

A traves del bioensayo planteado en la metodología se confirma el carácter patógeno de la cepa aislada inicialmente, los peces que desarrollaron signos de enfermedad fueron alimentados por via oral con "esporas", estructuras derivadas de la etapa micelial, las cuales fueron llamadas por Okamoto *et al* en 1987 "cuerpos esféricos de pared delgada. En este trabajo se establece a estas como la forma infectiva, mientras que los peces alimentados con micelio unicamente , no mostraron cambios. Con relación a el uso de *Artemia salina* como organismo transmisor de la enfermedad, aunque nuestros resultados fueron negativos, sería recomendable que se perfeccionara el modelo de trabajo antes de descartar en forma definitiva esta posibilidad.

Por otra parte los peces (bagres) usados en el bioensayo, además de desarrollar signos de la enfermedad, presentaron cultivos positivos en los cuales se logró recuperar la cepa inoculada experimentalmente (*I.hoferi*) y en los cortes histológicos practicados a los órganos de estos peces se confirma la presencia de este hongo, el cual se desarrolla en cerebro y riñon.

Por lo anterior se confirma la presencia de *I. hoferi* en robalos (*M.salmoides*) y mojarra (*Tilapia sp.*) cultivadas en piscifactorías del noreste de México, reafirmando a su vez que *I. hoferi* es un zigomiceto en apoyo a el criterio de Waterhouse (1973) y Okamoto *et al* (1987) que lo ubican como tal en el orden de los Entomophthorales.

RESUMEN

Nuestro estudio comprende el aislamiento de *I. hoferi* en robalos *M. salmoides*, mojarra *Tilapia sp.*, y bagres de canal *I. punctatus*. cultivados en forma intensiva en el noreste de México. Lo anterior se llevó a cabo con un muestreo que tuvo 11 meses de duración de Febrero a Diciembre de 1987 en piscifactorías de los estados de Coahuila, Nuevo León, y Tamaulipas. Se determinó una prevalencia acumulada para las tres especies de un 30.30 % de infección. Se realizó el aislamiento por medio de cultivos in vitro con medios químicamente definidos. En estos cultivos se logró observar 8 formas diferentes del hongo. En forma paralela se efectuó el estudio histopatológico en el cual se demostró la presencia del hongo en riñón y branquias tanto de robalos como en tilapias, mas no así en bagres ya que estos fueron negativos, para esto se utilizaron las técnicas de hematoxilina eosina y ácido peryódico de Schif. Se inocularon peces con el objetivo de demostrar la capacidad del hongo aislado para causar infección, solo en 2 de los 5 que se inocularon en forma oral con micelio y esporas se observaron signos de enfermedad como nado en espiral. A estos peces se les disectó, de sus organos se aislo por cultivo el agente etiológico, y se confirmó su presencia por técnicas histológicas en riñón y cerebro. Además se realizó el estudio de ultraestructura de *I. hoferi* en el se confirmó la presencia de 3 capas que componen la pared celular, la fusión de vesículas a el plasmalema, y la ausencia de el "Spitzenkörper" en el complejo vesicular apical de las hifas el cual es característico de hongos con micelio septado.

LITERATURA CITADA.

- Bailey, T.A., K. Bradford, y C.E. Bland. 1990. Induction of sporulation and the influence of time, temperature, and inoculum size on growth in two species of aquatic fungi (saprolegniales). *J. of the Elisha Mitchell Soc.* 106(3),pp 57-63.
- Beaver, P. 1986. *Parasitología Clínica*. Salvat. México. p.11-13.
- Bioxon. 1990. *Catalogo de medios de cultivo N° 2*. México 46p
- Boletín de Acuicultura. 1987. *Seguros acuícolas*. SEPESCA. Vol#5.
- Burnett, J.H. 1986. *Fundamentals of Mycology Sec. Edition*. Ed Arnold (publishers) London. PP103-134.
- Caullery, M. and F. Mesnil.1905. " Sur des haplosporidies parasite de poissons marins," *Compt. Rend. Soc. Biol. Paris*, 56: 640-643.
- Clinton J. Dawes. 1988. *Introduction to Biological Electron Microscopy*. Ladd Research Industries Inc. Ed. Burlington, Vermont. USA PP315.
- Cole, G.T. 1986. *Models of Differentiation in Conidial Fungi*. *Microbiological Reviews*. Vol. 50. No 2. 95-132.
- Daniel, G.E. 1933. *Studies on Ichthyophonus hoferi, a parasitic fungus of the herring (Clupea harengus)*. *Am. J. Hyg.* 17: 267-276, 491-501.

- Dorier, A. & C. Degrange. 1961. L'évolution de *Ichthyosporidium (Ichthyophonus) hoferi* (Plehn and Mulsow) chez le salmonides d'élevage (truite Arc en ciel et saumon de fontaine). Trav. Lab. Hydrobiol. Piscicult. Univ. Grenoble 52/53: 7-44.
- Erickson, J.D. 1965. Report on the problem of *Ichthyosporidium* in rainbow trout *Progressive Fish Culturist*. 27:179-184.
- Emerson, S. 1950. The growth phase in *Neurospora* corresponding to the logarithmic phase in unicellular organisms. *J. Bacteriol.* 60- 221-223.
- Gamez, C. S. 1991. Efecto de las hormonas esteroidales sexuales sobre el dimorfismo de *Sporothrix schenckii*. tesis (inérita). FCB, UANL.
- Grove, S. N. y C. E. Bracker. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and spitzenkörper. *J. Bacteriol.* 104, Nº 2- 989-1009.
- Gustafson, P.V. and R.R. Rucker 1956. Studies on an *Ichthyosporidium* infections in fish. Transmission and host specificity. U.S. Fish and Wildlife Service. Special Scientific Report-Fisheries; 166-168.
- Hendricks, J. D.1972. Two New Host Species for the Parasitic Fungus *Ichthyophonus hoferi* in the Northwest Atlantic. *J. Fish. Res. Board of Canada*, Vol. 29, No 12.
- Hofer, B. 1893. "Eine Salmoniden - Erkrankung". *Allg. Fish. Ztg., München*. 8: 168-171.
- Hofer, B. 1904. *Handbuch der Fischkrankheiten*. München. 359 p.

- Hy Clone Lab. Inc. 1988. Preparing a fetal bovine serum control mixture. Art to Science in tissue Culture. Hy Clone Lab ed. 7:1-6.
- Huxley, T.H. 1882. Saprolegnia in relation to salmon disease. Q.Jl. microsc. Sci. 22, 311.
- Jimenez, G.F., L. Galaviz S., F. Segovia S., H. Garza F. y P. Wesche E. 1986.
Parásitos y enfermedades del Bagre, *Ictalurus* spp. Publicación técnica No 2.
Subdirección de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Koneman, E.W. and G.D. Roberts. 1988. Practical Laboratory Micology. Third Edition.
Williams and Willkins. pp:111-119.
- Luna L.G. 1968. Manual of the Armed Forces Institute of Pathology. Third edition
McGraw-Hill Book Company. 258. p.
- Neresheimer, E. & C. Clodi. 1914 *Ichthyophonus hoferi* Plehn and Mulsow, der Errenger der taumelkrankheit der salmoniden. Arch. Protistenk. 34: 217-248.
- McManus, J.F.A. 1948. Stain Techn (AFIP modification) copyright by Williams and Wilkins Co. pp 158-160. in Luna L.G. (ed). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition McGraw Hill Book Company.
- Okamoto, N., K. Nakase, H. Susuki, Y. Nakai. K. Fujii & T. Sano. 1985. Life history and morphology of *Ichthyophonus hoferi in vitro*, Fish pathology, 20: 273-285.

- Okamoto, N., H. Susuki, K. Nakase & T. Sano. 1987. Experimental oral infection of rainbow trout with spherical bodies of *Ichthyophonus hoferi* cultivated Nippon Suisan Gaak. 53.407-409.
- Plehn, M. & K. Mulsow. 1911. der Erreger der Taumelkrankheit der Salmoniden. Zentralbl. Bakt., Jena 59: 63-68.
- Post, G. 1983. Diseases of Fishes. T.F.H. publications, Inc. Ltd. Canada. 256p.
- Reichenbach-Klinke, H. 1973. Fish pathology. T.F.H. Publ., Neptune, NJ. U.S.A. p. 102-123.
- Reichenbach-Klinke, H.H. 1982. Enfermedades de los peces, Editorial Acribia, Zaragoza, España. 509 pp.
- Roberts, R.J. 1981. Patología de los peces. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, España 130 pp.
- Rucker R. R., and P. V. Gustafson 1953. An epizootic among rainbow trout. Prog. Fish-Cult., 15(4): 179-181.
- Scatergood, L. 1948. A report on the appearance of the fungus *Ichthyosporidium hoferi* in the herring of the northwestern Atlantic. U.S. Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report No 58.
- Schaperclaus, W. 1953. Fortpflanzung und Systematik von *Ichthyophonus*. Die Aqu. Terr. Z. 6: 177-182.

Schapercläuis, W. 1954. Fisch- Krankheiten. Akad. Verlag. Berlin. 708 pp.

Sitja-Bobadilla, A. & P. Alvarez -Pellitero. 1990. First report of Ichthyophonous disease in wild and cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* from the spanish mediterranean area. Dis. Aquat. Org. 8: 145-150.

Sinderman, C.J. & L.W. Scatergood. 1954. Diseases of Fishes of Western North Atlantic. II. (*Clupea harengus*). Maine Dept. Sea Shore Fish. Res. Bull. 19: 1-140.

Sprague, V. 1965. *Ichthyosporidium* Caullery and Mesnil, 1905, name of fungi or genus of sporozoans. Zool., 14:110-114.

Sproston, N. 1944. *Ichthyosporidium hoferi* (Plehn and Mulsow, 1911.) an internal fungoid parasite of the mackerel. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 26: 72-98.

Van Duijn, C. 1967. Diseases of Fishes. London Liffe Books Ltd. pp 211-212.

Waterhouse, G.M. 1973. Entomophthorales chapter 12, pp 219-221 In G.C. Ainsworth (ed) The Fungi. vol IV. Acad. Press. New York.

Wolke, R.E. 1975. Pathology and bacterial and fungal disease affecting fish, pp 33-116 In W.E. Ribelin & Migaki (ed) The Pathology of Fishes. Wisconsin Press, Madison.

ANEXO DE FIGURAS

