

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

Determinación de presencia de *Renibacterium salmoninarum* y caracterización renal de lesiones histopatológicas presentes en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en crianza comercial

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Leonidas Adolfo Talavera Zúñiga

Lima-Perú

2008

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos por su apoyo, comprensión y paciencia durante el largo recorrido de la realización del presente trabajo.

A mis dos amores Liz y mi hijo Arturo David, por que me dan las fuerzas necesarias para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis, Dra. Nieves Sandoval, por su gran apoyo y paciencia.

A mis amigos MV. Raúl Sánchez, MV. Roxana Palomino, MV. Evelyn Chávez, MV Román Tello, MV. Héctor Álvarez quienes me ayudaron con los comentarios y opiniones en la redacción del presente trabajo de tesis.

A los laboratorios de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria (sección virología) ambos de la FMV-UNMSM, por el apoyo brindado con los equipos para la realización de proceso de muestras del presente estudio.

A los profesionales; Biólogo Rubel Sarzo, Microbióloga Milagros Ponce, Licenciado Paúl Ávila, Biólogo Jorge Veliz, Ing. José Ore y trabajadores técnicos por su orientación y apoyo durante mis prácticas en el centro piscícola y posteriormente durante el muestreo de truchas para el presente trabajo.

INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS	v
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Situación actual de la acuicultura	3
Acuicultura e ictiopatología	3
Acuicultura mundial	3
Acuicultura nacional	4
2.1.4 Producción y exportación de Trucha Arcoiris	5
2.2 Trucha Arcoiris	7
2.2.1 Clasificación taxonómica	7
2.2.2 Poiquilotermia	7
2.3 Características generales del riñón de la Trucha Arcoiris	8
2.3.1 Localización y características anatómicas	8
2.3.2 Características histológicas	9
2.3.2.1 Porción excretora	9
2.3.2.2 Porción endocrina	9
2.3.2.3 Sistema retículoendotelial	9
2.3.3 Función renal	10
2.3.4 Irrigación renal	10
2.4 Propiedades físico químicas del agua para crianza de truchas	11
2.4.1 Propiedades físicas	11
2.4.1.1 Temperatura	11
2.4.1.2 Turbidez	11
2.4.1.3 Transparencia	12
2.4.2 Propiedades químicas	12
2.4.2.1 Oxígeno (Oxígeno disuelto).....	12
2.4.2.2 Amoniaco	12

2.4.2.3	Potencial de hidrógeno (pH)	12
2.4.2.4	Dióxido de carbono (CO ₂)	13
2.4.2.5	Alcalinidad	13
2.4.2.6	Nitratos	13
2.4.2.7	Nitritos	13
2.4.2.8	Dureza total	13
2.5	Aspectos epidemiológicos de enfermedad	14
2.5.1	La cadena epidemiológica	14
2.5.2	La enfermedad y el modelo de iceberg	15
2.5.3	Causas de enfermedades en los peces	15
2.5.3.1	Causas de orden físico	15
2.5.3.2	Causas de orden químico	16
2.5.3.3	Causas de orden biológico	16
2.5.3.4	Estrés	16
2.5.4	Interacción de las causas de enfermedad	17
2.5.5	Transmisión de las infecciones	17
2.5.5.1	Las fuentes de agentes patógenos	17
2.5.5.2	Los modos de transmisión	18
2.5.5.3	Las vías de penetración de los agentes infecciosos	19
2.5.5.3.1	Vía digestiva	19
2.5.5.3.2	Vía respiratoria	20
2.5.5.3.3	Vía transcutánea	20
2.5.6	Aspectos clínicos y patogénicos	20
2.5.6.1	Signos y lesiones macroscópicas	20
2.5.6.2	Lesiones renales	21
2.5.6.2.1	Trastornos circulatorios	21
2.5.6.2.2	Trastornos degenerativos y del crecimiento	22
2.5.6.2.3	Trastornos necróticos	22
2.5.6.2.4	Trastornos inflamatorios	22
2.5.6.3	Regeneración	23
2.5.6.4	Aspectos patogénicos	23
2.6	Renibacteriosis	24
2.6.1	Introducción	24
2.6.2	Etiología	24

2.6.2.1	Clasificación del Agente causal	24
2.6.2.2	Morfología	24
2.6.3	Epidemiología	25
2.6.3.1	Transmisión	27
2.6.3.2	Susceptibilidad	28
2.6.4	Signos clínicos	28
2.6.5	Lesiones	29
2.6.5.1	Macroscópicas	29
2.6.5.2	Microscópicas	29
2.6.6	Patogenicidad	30
2.6.6.1	Factores de virulencia	30
2.6.6.1	Patogenia	32
2.6.7	Diagnóstico de la enfermedad	33
2.6.7.1	Diagnóstico diferencial	35
2.6.7.2	Confirmación del diagnóstico	36
2.6.8	Prevención y control	36
2.6.8.1	Prevención	36
2.6.8.2	Control	37
2.6.8.2.1	Quimioterapia	37
2.6.8.2.2	Segregación de adultos	38
2.6.8.2.3	Erradicación	38
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1	Lugar de ejecución	39
3.2	Tamaño de muestra	39
3.3	Características de la muestra	40
3.4	Materiales	40
3.5	Métodos	40
3.5.1	Obtención de muestra	40
3.5.1.1	Obtención de muestras para inmunofluorescencia	41
3.5.1.2	Obtención de muestras para histopatología	41
3.5.2	Procesamiento de las muestras	41
3.5.2.1	Inmunofluorescencia indirecta	41
3.5.2.2	Histopatología	43
3.5.2.2.1	Clasificación de lesiones histopatológicas	43

3.6 Análisis de datos	44
IV. RESULTADOS	45
4.1 Estudio clínico y lesiones macroscópicas	45
4.2 Estudio renal mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	49
4.3 Estudio histopatológico	50
4.3.1 Cabeza renal	51
4.3.2 Cuerpo renal	53
V. DISCUSIÓN	60
VI. CONCLUSIONES	71
VII. RECOMENDACIONES	72
VIII. BIBLIOGRAFIA CITADA	73
IX. APENDICE.....	90

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Producción de Trucha Arcoiris desde 1993 a Octubre del 2008
- Cuadro 2.** Exportación de Trucha Arcoiris desde 1994 a Octubre del 2008
- Cuadro 3.** Parámetros físicos y químicos del agua para la crianza de trucha comercial
- Cuadro 4.** Valores establecidos por la severidad de acuerdo a la extensión del tejido afectado
- Cuadro 5.** Frecuencia de las alteraciones macroscópicas observadas en riñones, hígados y bazos de Truchas Arcoiris
- Cuadro 6.** Frecuencia renal de Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum*, determinadas por inmunofluorescencia indirecta
- Cuadro 7.** Frecuencia de las alteraciones macroscópicas observadas en riñones, hígados y bazos de Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum* por Inmunofluorescencia Indirecta
- Cuadro 8.** Frecuencia de alteraciones histopatológicas de las porciones anteriores de riñones en Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum* determinadas por Inmunofluorescencia indirecta
- Cuadro 9.** Frecuencia de alteraciones histopatológicas de cuerpos renales en Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum* determinadas por Inmunofluorescencia Indirecta

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluorescencia positiva: Tejido renal presenta fluorescencia asociada a las bacterias (Adaptado de CEFAS 2007)
- Figura 2.** Melanosis parcial de Trucha Arcoiris: (A) Zona pectoral. (B) Zona dorsal
- Figura 3.** Signos clínicos de Truchas Arcoiris: (A) Nado lento y superficial cerca de la reja de salida de agua. (B) Pez en el fondo de la poza
- Figura 4.** Riñones de Truchas Arcoiris. (A) Riñón pulposo y con granulomas (Flecha roja), granuloma hepático (Flecha azul), esplenomegalia y congestión (Flecha verde). (B) Riñón aparentemente normal. Partes anatómicas renales; (B.1) Cabeza renal, (B.2) Cuerpo renal. (C) Riñón totalmente pulposo
- Figura 5.** Improntas de riñones de Truchas Arcoiris: (A) Control positivo de la cepa Rs4/86 de *Renibacterium salmoninarum*, Diplobacilos fluorescentes a la inmunofluorescencia indirecta. IFI. 1000x. (B, C, D) Positivos a *Renibacterium salmoninarum* por inmunofluorescencia indirecta: Flechas Rojas. IFI. 1000x
- Figura 6.** Riñón de Trucha Arcoiris: (A) Granuloma en tejido de cabeza renal: Flecha. Hematoxilina y Eosina: H&E. 50x. (B) Aumento de centros melanomacrófagos en tejido de cabeza renal: Flecha. H&E. 400x. (C) Congestión en tejido de cabeza renal: Flecha. H&E. 100x
- Figura 7.** Riñón de Trucha Arcoiris: Tejido de cabeza renal con espora de hongo sistémico (Flecha Azul). H&E. 400x

- Figura 8.** Riñón de Trucha Arcoiris: Tejido de cuerpo renal; (A) Degeneración de gota hialina de túbulos renales (Flechas Azules). H&E. 400x. (B) Degeneración vacuolar de túbulos renales (Flechas rojas). H&E. 400x.: (C) Degeneración de gota hialina; Microvacuolas (Flecha Azul) y macrovacuolas (Flecha negra) en túbulos renales. H&E. 400x. (D) Necrosis coagulativa de túbulo renal, con ausencia de luz tubular (Flecha negra). H&E. 400x
- Figura 9.** Riñones de Truchas Arcoiris: Tejido de cuerpo renal; (A) Aumento de centros melanomacrófagos entre los túmulos (Flechas azules). H&E. 100x. (B, C) Granulomas entre los túbulos renales (Flechas azules). H&E. 100x. (D) Congestión (FlechasAzules). H&E. 400x. (E) Regeneración tubular, grupo de células basófilas (Flechas rojas). H&E. 100x
- Figura 10.** Riñón de Trucha Arcoiris. Cuerpo renal: Granuloma con espora de hongo sistémico (Flecha azul) y células gigantes (Flecha roja). H&E. 400x
- Figura 11.** Riñón de Trucha Arcoiris. Cuerpo renal: Engrosamiento de la membrana basal de glomérulos (Flechas azules). H&E. 400x
- Figura 12.** Hígados de Truchas Arcoiris. (A) Granuloma hepático. H&E. 100x. (B) Espora hongo sistémico en granuloma hepático. H&E. 400x
- Figura 13.** (A) Hígado de Trucha Arcoiris; Congestión hepática. H&E. 100x. (B) Bazo de Trucha Arcoiris; Bazo congestionado. H&E. 50x
- Figura 14.** Branquias de Truchas Arcoiris; (A, B) Células granulares Eosinofílicas en filamentos branquiales. H&E. 400x
- Figura 15.** Branquias de Trucha Arcoiris: Telangiectasia en lamela secundaria. H&E. 100x

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar *Renibacterium salmoninarum* por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en Truchas Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y caracterizar macroscópica y microscópicamente las principales lesiones asociadas con su presencia. Se colectaron 33 peces de engorde (ocho a nueve meses de edad) clínicamente enfermos de una Piscifactoría ubicada en la provincia de Huancayo-Junín-Perú; tomándose principalmente muestras de riñón para la determinación de *Renibacterium salmoninarum* por la técnica IFI y la descripción anatomohistopatológica de lesiones. Las alteraciones macroscópicas encontradas fueron riñones pulposos y granulomas, que a la fluorescencia indirecta resultaron positivos a *Renibacterium salmoninarum* con una frecuencia de 15,2% (5/33). Los hallazgos histopatológicos según los grados y clasificación de lesiones evaluados en las cinco muestras renales positivas por IFI se observaron en todo el riñón. En la cabeza renal, predominaron trastornos inflamatorios como granulomas, aumento de centros melanomacrófagos, y trastorno congestivo de escasos a leves, y a nivel del cuerpo renal, degeneración de gota hialina en células del epitelio tubular, trastornos inflamatorios como granulomas con o sin presencia de células epitelioides, granulomas con espora de hongo, aumento de centros melanomacrófagos, además, trastornos de tipo congestivo y regeneración tubular de manera escasa a moderada. Se concluye, que el *Renibacterium salmoninarum* está presente en una piscifactoría de la Región Junín del Perú, donde las mayores lesiones microscópicas y macroscópicas encontradas están en el cuerpo renal, sin embargo es necesario para su confirmación el uso de una prueba diagnóstica molecular, así mismo, otro causante de granuloma renal de Truchas Arcoiris es el *Ichthyophonus sp.*

Palabras clave: Trucha Arcoiris, *Renibacterium salmoninarum*, inmunofluorescencia indirecta, granuloma, centros melanomacrófagos, células epitelioides.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine *Renibacterium salmoninarum* by the Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and characterize the main macroscopic and microscopic lesions associated with their presence. Thirty three were collected for fattening fish (eight to nine months old) clinically ill from a fish farm located in the province of Huancayo-Junin-Peru, mainly taking samples of kidneys for determining technical *Renibacterium salmoninarum* by the IFAT and the description anatomic histopathological injuries. The alterations were found macroscopic pulposus kidneys and granulomas, that the indirect fluorescence antibodies were positive for *Renibacterium salmoninarum* with a frequency of 15.2% (5/33). Pathological findings and classification according to the degrees of injuries in the five samples tested positive for kidney IFAT were observed throughout the kidney. In head kidney predominated inflammatory disorders such as granulomas, increased melanomacrophage centers, and congestive disorder low to mild, and level of the body renal hyaline droplet degeneration of the epithelial cells tubular, inflammatory disorders such as granulomas with or without the presence of epithelioid cells, with spores of granulomas fungal, melanomacrophage centers increased further disruption of congestive type and tubular regeneration so low to moderate. We concluded that the *Renibacterium salmoninarum* is present at a farm in the Junin Region of Peru, where the largest macroscopic and microscopic lesions are found in the body kidney, but it is necessary for confirmation by the use of a molecular diagnostic test, also another cause of renal granuloma Rainbow Trout is the *Ichthyophonus sp.*

Key words: Rainbow trout, *Renibacterium salmoninarum*, indirect fluorescent antibody technique, granuloma, melanomacrophage centers, epithelioid cells.

I. INTRODUCCIÓN

La Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) es una de las especies introducidas de mayor importancia económica en nuestro país, estableciéndose numerosas piscigranjas principalmente en la región Puno y Junín por la alta demanda del producto.

Las patologías infecciosas están relacionadas con la producción intensiva y es un tema importante en la moderna explotación de Truchas, que van de la mano con nuevas tecnologías de diagnóstico. En nuestro país el conocimiento de los problemas sanitarios que afectan la producción son escasos e incompletos, comparado a otros países vecinos como Chile, a pesar del crecimiento observado en la producción de Truchas. Actualmente no hay estudios de investigación sobre Renibacteriosis en Truchas Arcoiris de cultivo en el Perú, ni su repercusión. Sin embargo hay observaciones tanto macroscópicas como microscópicas en el riñón de truchas que nos sugieren la presencia de la enfermedad en nuestro medio.

La determinación de *Renibacterium salmoninarum* en nuestro medio es un punto de partida para el estudio de esta enfermedad, y así poder determinar las posibles causas implicadas, medidas de prevención, contribuir con la normatividad de importación de reproductores y ovas embrionadas, así como el conocimiento del manejo sanitario y tratamiento de este proceso infeccioso.

La Renibacteriosis es una enfermedad intracelular, sistémica crónica, de transmisión vertical y horizontal, ocasionando retardo del crecimiento, pobre conversión alimenticia, alteración crónica paulatina de órganos importantes como el riñón, hígado, bazo y desencadenando la muerte, afectando la productividad.

Por estas razones, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *Renibacterium salmoninarum* por el método de Inmunofluorescencia en Truchas Arcoiris de cultivo y caracterizar sus principales lesiones macroscópicas y microscópicas asociados con su presencia.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Situación actual de la acuicultura

2.1.1 Acuicultura e ictiopatología

La acuicultura es una actividad productiva en ambientes seleccionados y controlados de especies que se desarrollan en el medio acuático. Implica la interacción entre el hombre y el agua aplicando técnicas competitivas en calidad sanitaria y comercial para utilidad humana. Es una nueva alternativa para la administración de los recursos acuáticos (Cuéllar, 1984; FAO 1999).

La ictiopatología es una ciencia que desempeña un rol muy importante en la conservación de la fauna íctica (Mateo, 1972). La ictiopatología, en el sentido más amplio, comprende las causas, consecuencias y tratamientos de enfermedades, abarcando diversos campos de la medicina veterinaria especializada en el estudio de enfermedades de los peces (Cuéllar, 1984).

2.1.2 Acuicultura mundial

La expansión de la acuicultura continúa, mientras que la pesca marina mundial de captura, parece haber alcanzado un límite (FAO, 2006). Cerca del 45% del pescado para consumo humano (48 millones de toneladas) procede de piscifactorías. Para el 2030, el incremento de dos mil millones de personas significará que la acuicultura necesitará

producir 85 millones de toneladas de pescado anuales, para mantener los niveles de consumo (Kourous, 2007).

En los últimos 30 años, la acuicultura a nivel mundial ha experimentado una tasa anual de crecimiento del 11,1%, que de acuerdo con la FAO es la mayor tasa de crecimiento en lo referido a la producción de alimentos (Luna *et al.*, 2005). Las condiciones para un crecimiento sostenido de la acuicultura, en especial en América del Sur y África, son buenas, así mismo, la producción acuícola en los países en desarrollo ha sido superior al registrado en los países desarrollados. Por otro lado, se ha identificado que las principales dificultades y/o desafíos a mayor intensificación, estarán en el ámbito ambiental y sanitario (FAO, 2006).

La producción de salmónidos a nivel internacional en el año 2005 alcanzó la cifra de 1'986,213 TM (Tacón, 2007), de las cuales la Trucha Arcoiris participa con el 25% (495577 TM) (USDA, 2007). Los principales y mayores productores de Trucha Arcoiris son Chile y Noruega, con participaciones de 22% (109027 TM) y 11% (54513 TM) respectivamente (USDA, 2007).

2.1.3 Acuicultura nacional

En el desarrollo cronológico de la acuicultura en el Perú, la Trucha Arcoiris es la especie pionera, es así, que en 1928 se importó 50,000 ovas embrionadas procedentes de los EE.UU. a un criadero particular en La Oroya, comenzando una política de repoblamiento en aguas andinas (Godoy, 2002). Contando el Perú con características geográficas, hidrográficas y climáticas adecuadas para el desarrollo de la acuicultura de diversas especies, sin embargo, se ha concentrado en pocas especies (Luna *et al.*, 2005). La producción acuícola nacional en el 2007 se incremento 35% con relación a la registrada el 2006. La acuicultura en el Perú está orientada a la producción de concha de abanico, langostinos, trucha, tilapia y algunos peces amazónicos. La producción de origen marino representa el 79% y la de origen continental 21%. En el ámbito marino predomina el cultivo de concha de abanico (61%) y langostinos (39%). En el ámbito continental predomina la trucha (74%), tilapia (22%), otras especies (4%) (PRODUCE, 2008b).

Información al 2007 señalan que la exportación de productos de la acuicultura, superó en un 21% a la registrada en el año 2006, siendo los principales recursos de acuicultura los langostinos (9,023.36 TM), concha de abanico (3,131.40 TM), Trucha Arcoiris (795.35 TM) y tilapia (8.33 TM), con ingresos por US\$ 78.21 millones (PRODUCE, 2008b).

2.1.4 Producción y exportación de Trucha Arcoiris

La producción de truchas en el Perú entre los años 1993 al 2007 (Cuadro 1), fue de 41,181 TM; de acuerdo a las informaciones obtenidas (PRODUCE 2008a, b, c).

Cuadro 1. Producción de Trucha Arcoiris desde 1993 a Octubre del 2008

Año	Producción TM
1993	584
1994	768
1995	930
1996	1094
1997	1147
1998	1479
1999	1608
2000	1928*
2001	2586*
2002	2981*
2003	3111*
2004	4699*
2005	5475*
2006	5794*
2007	6997*
2008 ¹	5514*

Fuente: PRODUCE-OGTIE (Oficina general de tecnología de la información y estadística)

ELABORACION: DGA (Dirección general de acuicultura)

* DIREPRO (Direcciones Regionales de Producción) y Empresas Acuícolas

(1) Enero - Octubre 2008

Las Exportaciones de truchas entre los años 1993 al 2007 (Cuadro 2), fue de 5,329 TM (PROMPEX, 2000; PRODUCE, 2008c). Siendo los principales destinos de dichas exportaciones Canadá, Estados Unidos y Noruega. La exportación de trucha en el período de Enero a Setiembre del 2007 se realizó en doce partidas, de las cuales la

trucha congelada concentró el 48% del total de las exportaciones, de los cuales Piscifactoría Los Andes representa el 97% de las exportaciones (Chuquín, 2007).

Cuadro 2. Exportación de Trucha Arcoiris desde 1994 a Octubre del 2008

Año	Exportación TM
1994	443*
1995	183*
1996	77*
1997	196*
1998	116*
1999	181*
2000	207**
2001	276**
2002	361**
2003	441**
2004	422**
2005	754**
2006	857**
2007	795**
2008 ¹	463**

Fuente:

* PROMPEX 2000

** PRODUCE 2008c

Empresas Acuícolas y a partir del 2003 la Superintendencia de Administración Tributaria (SUNAT) - Oficina de Estadística

(1) Enero – Octubre 2008)

La globalización y la apertura comercial exigen el cumplimiento de normas sanitarias, es así, que la Organización Mundial del Comercio (OMC) reconoce las normas dictadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como el organismo competente de las medidas sanitarias aplicables a las importaciones y exportaciones de animales y productos acuáticos. Los estándares aplicables al intercambio internacional de animales acuáticos están en el código sanitario para los animales acuáticos como referencia reglamentaria y cuando se necesita recurrir a pruebas de diagnóstico las recomendaciones técnicas figuran en el manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos de la OIE. Así mismo, una de las bacterias que se le aplica los requisitos de notificación de enfermedades no inscritas en la OIE es aquel producido por el *Renibacterium salmoninarum* por su importancia epidemiológica de mortalidad, morbilidad y económica que afecta a las Truchas (OIE, 2008).

2.2 Trucha Arcoiris

2.2.1 Clasificación taxonómica

Según Smith and Stearley (1989) y Eschmeyer (2007):

Reino	:	Animalia
Phylum	:	Chordata
Sub Phylum	:	Vertebrata
Clase	:	Actinopterygii
Orden	:	Salmoniformes
Sub Orden	:	Salmoneidei
Familia	:	Salmonidae
Género	:	Oncorhynchus
Especie	:	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

Nombre Vulgar	:	Trucha arcoiris
Nombre Ingles	:	Rainbow trout.

2.2.2 Poiquilothermia

Es de gran importancia conocer la relación de la vida acuática y patológica, es así que, la fisiología de los peces está regida por la Poiquilothermia, que tiene por definición, incapacidad de regulación de la temperatura del cuerpo, por lo que esta varía de acuerdo con la temperatura ambiental (Roberts, 1981; De Kinkelin *et al.*, 1991). Cada especie vive dentro de unos límites térmicos que le son propios, más allá de los cuales con temperaturas superiores o inferiores, alteran la homeostasis y pueden llegar a ser letales. El soporte nutricional y estructural de la poiquilothermia lo constituye el alto grado de instauración de los Ácidos Grasos (AG), predominantemente la serie omega 3 ($\omega 3$) más que la omega 6 ($\omega 6$) en Truchas Arcoiris. Un régimen lipídico no apropiado repercutirá sobre su sistema inmune y los rendimientos zootécnicos (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.3 Características generales del riñón de la Trucha Arcoiris

2.3.1 Localización y características anatómicas

El riñón de la Trucha Arcoiris, está localizado en una posición retroperitoneal, ventral a la columna vertebral y dorsal a la vejiga natatoria, extendiéndose desde la parte posterior de la cabeza hasta el ano, tapizando toda la parte superior de la cavidad abdominal. Su forma es aplanada con la parte craneal dividida en dos lóbulos, la porción caudal termina en forma aguda. Representa el 0,5% del peso corporal del pez, presentando una coloración que va de marrón oscuro a negro. Se encuentra firmemente adosado al tejido esquelético y muscular, siendo cubierto por una cápsula de tejido conectivo de tipo fibroso (Vega, 2004).

Anatómicamente, el riñón en teleósteos puede ser lobulado o fusionado haciéndose esta variación mas marcada entre especies de agua dulce y marinas (Reimshuessel, 2001). En salmónidos el riñón esta fusionado como un órgano único (Cepeda y Oróstegui, 2000). La porción anterior o cabeza posee tejido hematopoyético, linfoide y endocrino; y la porción posterior denominada cuerpo, posee tejido excretor, tejido intersticial hematopoyético y linfoide (Reimshuessel, 2001; Ferguson, 2006). El tejido hematopoyético es, por lo general el lugar de elección donde se concentran los agentes de infecciones generalizadas, originando granulomatosis crónica (Roberts, 1981; De Kinkelin *et al.*, 1991).

Embriológicamente, la cabeza del riñón deriva de pronefros y el cuerpo de mesonefros. En carpas y peces dorados, es posible diferenciar las dos partes (Hibiya, 1982), mas no, en salmónidos (Roberts, 1981). Los uréteres pueden fusionarse y dilatarse formando la vejiga urinaria (Roberts, 1981), posteriormente los conductos urinarios desembocan en la parte externa y posterior al ano (Vega, 2004).

2.3.2 Características histológicas

2.3.2.1 Porción excretora

La unidad funcional del cuerpo del riñón es el nefrón, el cual consiste en glomérulo, segmento del cuello, 2 porciones de túbulos contorneados proximales, segmento intermedio, túbulo contorneado distal, conductos colectores y sin asa de henle (Hibiya, 1982). El glomérulo es un ovillo de capilares con arteriolas aferentes y eferentes, formadas de células endoteliales, rodeado por la cápsula de Bowman. Los espacios entre los capilares se encuentran ocupados por células mesangiales (Ferguson, 2006). El conducto colector el cual es de mayor diámetro posee tejido epitelial más grueso y están rodeados por músculo liso y tejido conectivo. (Hibiya, 1982; Cepeda y Oróstegui, 2000; Vega, 2004).

Una diferencia entre peces dulce acuícolas y marinos es que a estos últimos carecen del segmento intermedio y el distal donde tiene lugar la dilución de la filtración tubular, además existe un escaso desarrollo o ausencia de glomérulos (Cepeda y Oróstegui, 2000; Ferguson, 2006).

2.3.2.2 Porción endocrina

Alrededor de los vasos sanguíneos del riñón anterior, se agrupan células productoras de cortisona y células cromafines responsables de la secreción de adrenalina y noradrenalina. Por otra parte, están los Corpúsculos de Stannius regulando el metabolismo del calcio y el aparato yuxtaglomerular productor de enzimas como la renina (Roberts and Shepherd, 1980; Hibiya, 1982; Vega, 2004).

2.3.2.3. Sistema retículoendotelial

Se encuentra presente en mayor proporción en la cabeza renal y está compuesto de células fagocíticas como monocitos circulantes, macrófagos y células melanomacrofágicas que poseen pigmento melánico en su citoplasma y gran capacidad fagocitaria (Roberts, 1981).

2.3.3. Función renal

Gran parte de la función excretora del riñón de mamíferos se cumple por difusión branquial en los peces. La principal función renal excretora es la osmorregulación (Ferguson, 2006). El riñón juega un papel compensador produciendo una gran cantidad de orina diluida, para contrarrestar la gran cantidad de agua que se introduce a través de las branquias (Roberts, 1981; Hibiya, 1982; De Kinkelin *et al.*, 1991; Ferguson, 2006). El segmento distal es donde tiene lugar la dilución de la filtración tubular con reabsorción de cloro y sodio (Vega, 2004, Ferguson 2006).

En los animales superiores el riñón es simplemente un filtro selector, pero en los peces contiene tejido hemopoyético, especialmente en el extremo anterior del riñón. Es este tejido que forma hematíes que conducen el oxígeno y los glóbulos blancos que actúan en la defensa del organismo (Roberts and Shepherd, 1980).

El sistema reticuloendotelial (SER) está constituido de células fagocíticas las cuales llevan material particulado que consta en desechos metabólicos, de origen bacteriano o células envejecidas, a los centros melanomacrófagos (CMM) que están ausentes en vertebrados superiores pero sí presentes en teleósteos (Cepeda y Oróstegui, 2000; Vega, 2004).

2.3.4 Irrigación renal

El riñón de la Trucha Arcoiris tiene un suministro de sangre duplicado desde la arteria renal y las venas portorreales. La arteria renal deriva directamente de la aorta dorsal y suministra sangre a alta presión a la capa de capilares glomerulares a través de las arteriolas aferentes, esta sangre produce la filtración glomerular. Los vasos eferentes de los glomérulos abastecen a la red capilar que rodea los túbulos renales (Roberts y Shepherd, 1980; Vega, 2004; Ferguson, 2006).

2.4 Propiedades físico químicas del agua para crianza de Truchas Arcoiris

En general el agua de alimentación para una piscigranja desde el punto de vista físico debe tener una temperatura óptima, ser transparente, fresca y libre de materiales en suspensión (MES). Desde el punto de vista químico, el agua debe estar suficientemente oxigenada, las aguas alcalinas son más favorables por ser productivas y ricas en alimento natural (Cuadro 3) (Godoy, 2002).

2.4.1 Propiedades físicas

2.4.1.1 Temperatura

Es un factor físico que juega un papel importante en la presencia del oxígeno, para el proceso fisiológico y metabólico de la trucha (Godoy, 2002). Las temperaturas para las etapas fisiológicas son las siguientes (Roberts y Shepher, 1980; De Kinkelin *et al.*, 1991; Godoy, 2002):

- Temperatura para maduración sexual, reproducción 8-11 °C;
- Temperatura para incubación, eclosión y larvas 8-10 °C
- Temperatura para alevinaje 10-15 °C
- Temperatura para crecimiento 12-17°C

2.4.1.2 Turbidez

Esta dado por la presencia de MES, sustancias inorgánicas disueltas (arrastradas por precipitaciones, crecidas de río, poluciones de canteras, arenales y minería) o por material orgánico (acuicultura intensiva los desechos y heces son fuentes de MES) presente en el cuerpo de agua. Para incubación de los huevos de salmónidos debe tener menos de 25 mg/L. Para el resto menos de 75 mg/L, ya que 80 mg/L de los sólidos suspendidos provoca la mortalidad de larvas y asfixia los huevos de truchas (De Kinkelin *et al.*, 1991; Godoy, 2002).

2.4.1.3 Transparencia

Viene a ser el grado o distancia que recorre el rayo luminoso en el cuerpo del agua, se utiliza el disco de Secchi para ambientes o cuerpos de aguas lénticos. Permite inferir el grado de productividad biológica del ambiente acuático (Godoy, 2002).

2.4.2 Propiedades químicas

2.4.2.1 Oxígeno (Oxígeno disuelto)

Es el gas disuelto más importante en el agua, se considera un nivel mínimo de 6 – 9 mg/L para el caso de la Trucha Arcoiris (PRODUCE, 2004), sin embargo puede llegar a tolerar hasta 2 mg/L por solo unos momentos y si se trata de aguas de abundante caudal (Brown, 2000).

2.4.2.2 Amoniaco

Es el principal producto nitrogenado de desecho del metabolismo de los peces excretado principalmente por las branquias, pero también se forma de la descomposición de la materia fecal (De Kinkelin *et al.*, 1991; Brown, 2000). Se considera niveles menores a 0.02 mg/L y 0.0255 mg/L (De Kinkelin *et al.*, 1991; PRODUCE, 2004). Para el amonio se consideran concentraciones menores a 0.012 mg/L (Godoy, 2004).

2.4.2.3 Potencial de hidrógeno (pH)

Es la medida del nivel de iones de Hidrogeno (H⁺) presentes en el agua, está relacionado con la dureza y la capacidad tamponante del agua. El rango óptimo para el caso de las truchas es de 6,5-8,5, es decir, ligeramente alcalino. Fuera de este rango pueden producirse efectos tóxicos directos y los niveles de estrés serán altos, ocasionando principalmente lesiones en las branquias (Brown, 2000; PRODUCE 2004).

2.4.2.4 Dióxido de carbono (CO₂)

Este gas se origina en la dilución de la atmósfera, la incorporación de aguas subterráneas, la descomposición de la materia orgánica y como producto residual del proceso respiratorio de los peces y otros organismos. Se considera un nivel de 4 mg/L (De Kinkelin *et al.*, 1991; Brown, 2000).

2.4.2.5 Alcalinidad

Es la medida de la concentración de los iones carbonatos y bicarbonatos en el agua y refleja la capacidad tamponante, es decir, la resistencia al cambio de pH. Es recomendable un rango aceptable de 50 y 200 mg/L (PRODUCE, 2004; Mantilla, 2004).

2.4.2.6 Nitratos

Estimula la flora acuática en presencia de otros elementos indispensables, aumentando la productividad del agua, sin embargo, cuando esta flora está en exceso se vuelve perjudicial. Los rangos establecidos para el cultivo de truchas indican que no sea mayor a 100 mg/L (PRODUCE, 2004; Mantilla, 2004).

2.4.2.7 Nitritos

Son productos intermedios de la degradación biológica de sustancias que contienen nitrógeno orgánico, son solubles en el agua y resultan de la oxidación del amoníaco. Los nitritos pueden inducir la producción de metahemoglobina con la consiguiente hipoxia y cianosis. Los niveles inferiores de la acción tóxica son los menores a 0.055 mg/L (Brown, 2000; PRODUCE, 2004; Mantilla, 2004).

2.4.2.8 Dureza total

Esta referida a la presencia de ciertas sales compuestas, a partir de carbonatos y bicarbonatos que se asocian con elementos alcalinos como calcio, magnesio, sodio y

otros. Su medición se expresa en mg/L de carbonato de calcio. Se recomienda la utilización de aguas con dureza total comprendida entre 80-250 mg/L para el cultivo de truchas (Mantilla, 2004).

Cuadro 3. Parámetros físicos y químicos del agua para la crianza de trucha comercial

Características	Rango permisible	Rango óptimo
Temperatura (C°)	6-20	10-18
Turbidez (mg/L)*	25-75	< 75
pH	7-9	7-8
Oxígeno disuelto (mg/L)	6-10	6-8
CO ₂ (mg/L)	0-4	0-2
NH ₃ (mg/L)**	0.01-0.017	< 0.01
Nitritos (mg/L)*	0.01-0.05	< 0.01
Alcalinidad (mg/L de CaCO ₃)	30-180	175
Dureza total (mg/L de CaCO ₃)	60-250	150-250

Fuente: Godoy (2002)

* De Kinkelin *et al.* (1991)

** Roberts and Shepherd (1980)

2.5 Aspectos epidemiológicos de enfermedad

2.5.1 La cadena epidemiológica

Los estados de salud y enfermedad son consecuencia de la interacción del agente, hospedador y medio. Se hace necesario conocer, relacionar las características y aspectos clínicos o patológicos con variables como la edad, estación del año, tipo de manejo, etc. (Peters, 2000), El balance de esta interacción será favorable al hospedador cuando el agente esta ausente o en bajas dosis, el hospedador pone en marcha mecanismos defensivos, el medio pone obstáculos a la difusión del agente, lo que da lugar a la denominada “cadena epidemiológica de la enfermedad” (Ruiz *et al.*, 2004).

2.5.2 La enfermedad y el modelo de iceberg

Por otro lado, la aparición de la enfermedad en una parte de la población animal no significa que sean sólo esos los animales que van a presentarla, ya que existe otra parte muy importante de la población que está infectada y no manifiesta clínicamente la enfermedad. Eso explica que las enfermedades infecciosas sigan un modelo de iceberg en el que la parte de población que sufre una infección inaparente es tan importante o más que aquella parte que manifiesta la enfermedad (Ruiz *et al.*, 2004).

2.5.3 Causas de enfermedades en los peces

2.5.3.1 Causas de orden físico

Principalmente constituidas por las propiedades físicas del agua tales como temperatura, contenido de materias en suspensión (MES), radiaciones, agresiones que resultan de las actividades y practicas piscícolas.

La temperatura puede actuar de forma directa produciendo un shock térmico (variaciones mayores o iguales a 7°C) generador de una reacción de estrés, con sus consecuencias energéticas (metabolismo basal, metabolismo de producción, motilidad gastrointestinal) o inmunológicas (bioagresores y medioambiente) (De Kinkelin *et al.*, 1991).

Inmunológicamente, temperaturas permisiva y no permisiva dependen de las especies de peces, es así que, la no permisividad de temperatura se ha establecido como 4 °C en los salmónidos, 14 °C en la carpa y 22 °C en el bagre (Bly y Clem, 1992). Las defensas inespecíficas tales como fagocitosis y la citotoxicidad en peces teleósteo tienden a compensar la supresión inmune específica mediada por células T helper en ambientes de baja temperatura hasta que el sistema inmune se adapta. El estudio de mecanismos de temperaturas más bajas que modulan la inmunidad inespecífica puede revelar los implicados en la modulación de la inmunidad específica (Le Morvan *et al.*, 1998). El deterioro de las funciones células T a bajas temperaturas se sugirió que depende de los cambios en la membrana plasmática de las células T (Bly y Clem, 1992).

2.5.3.2 Causas de orden químico

Estas son principalmente las propiedades y la composición del agua (pH, alcalinidad, contenido en gases disueltos, en materias nitrogenadas, en toxinas segregadas por algas, o en diversos contaminantes tales como cloruros, sulfatos, mercurio, ácidos, pesticidas, clorofenoles, detergentes, hidrocarburos, etc.). El segundo grupo de factores de orden químico está constituido por la alimentación considerada desde un punto de vista tanto cualitativo por toxinas y desequilibrios o carencias, así mismo, como cuantitativo con racionamientos en exceso afectando la calidad del agua.

La forma tóxica sin ionizar del amoníaco (NH_3) puede causar lesión en el epitelio branquial con la consiguiente hiperplasia y reducción de la capacidad de captar oxígeno. Asimismo puede lesionar hígado, riñón y cerebro con reducción de la actividad y del crecimiento. Niveles bajos de amoníaco puede producir estrés crónico (Brown, 2000).

2.5.3.3 Causas de orden biológico

Los bioagresores como Necrosis Hematopoyética Viral (IHN), *Renibacterium salmoninarum* (BKD), *Ichthyophonus hoferi* y parásitos Mixosporidios (esporas), representan las causas biológicas de enfermedad (Roberts, 1981).

2.5.3.4 Estrés

Debemos recordar que pueden desencadenar brotes de enfermedades infecciosas debido a situaciones medioambientales adversas, que incluyen cualquier estrés que actúe sobre el pez o bien por cambios en el medio físico o bien por la propia gestión de los peces como manejo, sobredensidad, clasificación, administración de tratamientos (Ruiz *et al.*, 2004).

El estrés deprime la inmunidad y susceptibiliza a los peces a la acción patógena de las bacterias (Roberts, 1981; De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.4 Interacción de las causas de enfermedad

La fisiología de una especie determinada estará influenciada por la temperatura del agua y su receptividad frente a los agentes infecciosos será muy diferente. La temperatura condicionará al mismo tiempo, el contenido de oxígeno disuelto en el agua, ya que existe una relación inversa cuando más elevada está la temperatura, menos oxígeno disuelto hay en el agua, condicionando los otros parámetros de calidad del agua a los cuales el pez es sensible, repercutiendo sobre todas sus funciones, incluidas las de defensa, sensibilizando al pez a los bioagresores (De Kinkelin *et al.*, 1991; Godoy, 2002).

Un ejemplo importante de interacción de las causas de orden químico y físico es la toxicidad del amoníaco que está regulado a la vez por el pH, la temperatura, la salinidad y el contenido de oxígeno del agua para una especie de peces en un estado fisiológico determinado (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.5 Transmisión de las infecciones

2.5.5.1 Las fuentes de agentes patógenos

El pez, constituye la principal fuente de los agentes infecciosos. Las condiciones de explotación intensiva favorecen la eclosión de las enfermedades debidas a los bioagresores. Los peces albergan a los bioagresores según distintas modalidades que van desde el portador sano, al animal inmune pasando por el enfermo clínicamente detectable.

La liberación de bacterias por los peces enfermos puede hacerse a través de lesiones cutáneas abiertas, por diversas secreciones o excreciones, pero igualmente en el momento de la descomposición de los cadáveres. La persistencia sistemática a continuación de episodios infecciosos, lo que en vista de la débil inmunidad, explicaría las frecuentes recidivas observadas y debidas a cepas siempre parecidas.

Bullock y Stuckey (1975a) han puesto a punto una técnica que asocia un choque térmico a la inyección de corticoides y destinada a provocar la manifestación de la enfermedad en los peces sospechosos. McCarthy y Roberts (1980) mencionan que la aplicación de este método ha permitido atestiguar la amplia distribución de agentes infecciosos en salmónidos aparentemente sanos, mientras que las tasa de animales infectados parece que varían según las especies. Del mismo modo, el alojamiento de cepas atípicas, es muy frecuente en las demás especies aparte de las de *Salmonidae*, es así, que las interacciones microbianas contribuyen a diversificar los casos.

El agua, con sus características crearan un ambiente adecuado o inadecuado para la vida del pez, así como para la multiplicación de los agentes bioagresores (Ruiz *et al.*, 2004). La explotación intensiva ofrece un ejemplo contundente de inducción a la acción de los factores patógenos (De Kinkelin *et al.*, 1991).

La actividad humana viene a añadir nuevos riesgos como la polución introducen en el medio acuático sustancia peligrosas que no se encontraban originalmente allí, o desarrollando prácticas de la tecnología piscícola que aumentan los efectos patógenos de los factores físicos, químicos o biológicos presentes en el medio, haciéndolos patógenos para los peces (De Kinkelin *et al.*, 1991). El uso indiscriminado de antibióticos y, en especial, su administración para controlar o prevenir enfermedades de los peces, ha dado como resultado en ciertas ocasiones al desarrollo de comunidades microbianas resistentes a los mismos (Ruiz *et al.*, 2004).

En resumen las fuentes de bioagresores se diversifican si se aleja de las óptimas condiciones de explotación intensiva (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.5.2 Los modos de transmisión

La transmisión horizontal, se verá favorecida por la existencia de lesiones abiertas, portadores asintomáticos, por los comportamientos colectivos, por la sobre densidad. Tal contaminación en los peces necesita un contacto físico y se produce sobre todo en las explotaciones intensivas durante la selección y el transporte de los peces.

La transmisión vertical viene representado por progenitores infectados. En la mayoría de los casos los huevos embrionados son contaminados en la superficie y es sobre todo en la eclosión cuando, el alevín corre el riesgo de infectarse. En la Renibacteriosis, Klontz (1983) piensa, sin embargo, que la localización en el interior es lo habitual y que la transmisión vertical es lo normal para esta enfermedad.

La transmisión indirecta, está tan extendida ya, que la mayoría de las bacterias sobreviven bien en el medio exterior. Entre los vectores inanimados, el agua es evidentemente el más importante, y es cierto que en caso de fuertes liberaciones de agentes patógenos en el medio ambiente que son transportados en estado libre o en materias en suspensión. Los fondos y la vegetación constituirán, sobre todo, una amenaza según sean las costumbres alimenticias o el comportamiento cavador de ciertas especies. En las explotaciones, el material destinado a las manipulaciones así como el personal mismo son, para todas las enfermedades transmisibles, vectores muy temibles (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.5.3 Las vías de penetración de los agentes infecciosos

Las barreras mecánica y enzimática contra la introducción de las bacterias en el pez están conformadas por el moco que recubre la piel, las branquias y la mucosa intestinal. Así mismo, las materias en suspensión, los contaminantes químicos, tratamientos demasiados frecuentes y parasitismo externo causan un papel irritante. Sucede que el moco y la epidermis se ven alteradas, lo cual suministra un punto de anclaje a las colonias bacterianas y puede constituir el foco de origen de una infección (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.5.3.1 Vía digestiva

Las únicas certezas de penetración por vía oral de ciertas bacterias son las de Tuberculosis, Renibacteriosis y Estreptococias. En los demás casos la vía oral es un modo de contaminación no exclusivo (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.5.3.2 Vía respiratoria

La superficie branquial es recorrida por una corriente de agua, bajo una ligera presión, que aporta, al contacto, todos los elementos en suspensión en el medio acuático. Las bacterias oportunistas tienen la probabilidad de penetrar por esta vía en branquias lesionadas como la *Flavobacterium branchiophila* (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.5.3.3 Vía transcutánea

Numerosas bacterias pasan por esta vía y evolucionan a través de todas las soluciones de continuidad que pueden crear los traumatismos de manipulación o el parasitismo externo. No es dudosa para la mayoría de los agentes oportunistas hallados normalmente en la superficie de los peces, pero la cuestión es la aptitud de las bacterias para atravesar o para lesionar un tegumento intacto. Se llegan a producir lesiones típicas de la furunculosis por inyección intramuscular o subcutánea de bacterias virulentas (De Kinkelin *et al.*, 1991). Según Udey y Freyer (1978) la virulencia de *Aeromonas salmonicida* está ligada a su propiedad de adhesión a la superficie del pez. Esto hace pensar que muchos casos, las lesiones microscópicas, favorecen la penetración de los microbios. Estos argumentos indirectos enmascaran, por lo que hay desconocimiento de los mecanismos exactos que rigen la entrada de la mayoría de las bacterias ictiopatógenas en sus hospedadores.

2.5.6 Aspectos clínicos y patogénicos

2.5.6.1 Signos y lesiones macroscópicas

Todos los seres vivos cuando tienen alguna enfermedad manifiestan signos de varias maneras y los peces no son la excepción ya que pueden manifestarlos por alteraciones del comportamiento que afectan principalmente a las funciones de relación y de nutrición, las primeras trastornan el equilibrio estático o locomotor, el mimetismo, el dinamismo del animal que oscila entre la hiperexcitabilidad y la postración. Las funciones de nutrición requieren en primer lugar, apetito, la inapetencia es factor común en las grandes infecciones y, en todos los casos el indicador de la presencia de una

anomalía; el ritmo respiratorio es necesario observarlo, pues indica a menudo una afección branquial o una perturbación del medio ambiente (Rodríguez *et al.*, 2001).

Los signos, son considerados como modificaciones del comportamiento, portan poca información con respecto a la naturaleza bacteriológica de una infección. Puede que no aparezca si la enfermedad evoluciona en forma sobreaguda o, por el contrario, adopta un carácter crónico. Cualquiera que sea su combinación y la intensidad de su expresión, las manifestaciones clínicas en los peces raramente es patognomónica, así mismo, el cuadro clínico permite elegir una muestra y orientar al diagnóstico (De Kinkelin *et al.*, 1991).

Las lesiones externas afectan en primer lugar al estado general y a las proporciones corporales como el estado de conformación (Rodríguez *et al.*, 2001). En las lesiones por infecciones nodulares, sus manifestaciones externas son poco típicas, incluso, excluyendo el adelgazamiento que marca la evolución, puede hacer pensar en otra enfermedad. En el momento de la necropsia, se comprueban las lesiones más características. Los órganos internos están compuestos de granulomas de aspecto blanquizco, a menudo bien delimitados (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.6.2 Lesiones renales

El riñón es órgano blanco de muchas enfermedades de importancia económica, una razón es su afinidad por las partículas antigénicas circulantes (Ferguson, 2006).

2.5.6.2.1 Trastornos circulatorios

En riñón de salmónidos se describe hemorragias (petequias y equimosis) y congestiones renales por infecciones bacterianas y virales (Roberts, 1981; De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.5.6.2.2 Trastornos degenerativos y del crecimiento

Degeneración de gota hialina (macro y microvacuolas) se presenta como uno de los cambios degenerativos más frecuentes de túbulos renales proximales tanto en peces de cultivo como silvestres (Hibiya, 1982). Corresponde a material proteináceo que fuga de glomérulos dañados, en casos extremos se puede evidenciar picnosis y vacuolización citoplasmática (Roberts, 1981, Ferguson, 2006). Se puede encontrar gotas eosinofílicas hialinas en células de tejido tubular de peces aparentemente normales, en donde los núcleos y nucleolos celulares no presentan cambios evidentes (Hibiya, 1982; Ferguson, 2006).

Con relación a los trastornos del crecimiento estos se observan principalmente a nivel del tejido hematopoyético linfocitario y reticuloendotelial que proliferan frente a procesos de tipo infeccioso, así mismo, en tejido glomerular prolifera las células de los capilares y engrosamiento de la cápsula de Bowman producto de enfermedades locales o sistémicas (Roberts, 1981). La membrana basal glomerular puede presentar un engrosamiento difuso o segmentado como en el caso de BKD o por deficiencias de ácidos grasos esenciales en la dieta (Ferguson, 2006).

2.5.6.2.3 Trastornos necróticos

La necrosis de los túbulos renales se presenta como resultado de procesos degenerativos que comprometen al tejido hematopoyético adyacente. La necrosis del tejido hematopoyético del riñón puede estar acompañada de edema por pérdida de capacidad osmoreguladora, infiltrado inflamatorio y fibrosis (Roberts, 1981, Ferguson, 2006).

2.5.6.2.4 Trastornos inflamatorios

La presencia del tejido hematopoyético en intersticio renal, dificulta la interpretación de cambios inflamatorios (Ferguson, 2006), asimismo, las infecciones bacterianas generalizadas crónicas, tienen una evolución lenta y a menudo intracelular, así tenemos Tuberculosis y Renibacteriosis determinan una respuesta inflamatoria dominada por proliferaciones celulares cuya lesión típica es el granuloma. El esquema

evolutivo desde que proliferan los bacilos en un tejido, células linfocitarias y polinucleares se infiltran en el foco. La fagocitosis se intensifica y, en algunos días, los macrófagos sufren modificaciones morfológicas que llevan a la aparición de células epitelioides y de células gigantes (Roberts, 1981; De Kinkelin *et al.*, 1991; Jansson, 2002).

En la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) causada por *Renibacterium salmoninarum* describe granulomas subcapsulares y glomerulonefritis. Dichos granulomas pueden comprometer todo el órgano, originando nefritis y nefrosis (Fryer, 1989, Solar y Evelyn, 1991).

2.5.6.3 Regeneración

Al igual que los mamíferos, el riñón de los peces tiene la capacidad de regeneración de las células tubulares dañadas (Reimschuessel, 2001). La regeneración de túbulos renales de la Trucha Arcoiris, presenta frecuente mitosis y poseen poca cantidad de citoplasma (Hibiya, 2002). Estos surgen de los grupos de células basófilas en el intersticio, a menudo cerca de conductos colectores. Se pueden encontrar normalmente en peces en crecimiento, sin embargo, se puede encontrar en peces adultos lo que indica un episodio anterior de lesión tubular (Ferguson, 2006).

2.5.6.4 Aspectos patogénicos

Dentro de los aspectos patógenos, la forma en que se manifiestan depende fundamentalmente de la especie o variedad del pez debido a la susceptibilidad típica; patogenicidad del agente infeccioso; influencia del medio ambiente (calidad del agua) y manejo biotecnológico de las especies (Rodríguez *et al.*, 2001).

La noción de estructura o producción de superficie, conocidos como Factores de Virulencia permiten a las bacterias adherirse, colonizar epitelio sano o alterado, penetrar o sobrevivir intracelularmente, es así que, se manifiesta el poder patógeno de las bacterias (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.6 Renibacteriosis

2.6.1 Introducción

La Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) es una infección usualmente de carácter granulomatoso crónico que comúnmente provoca una elevada mortalidad en salmónidos, sin embargo, se producen brotes, especialmente a temperaturas moderadas (13-18 °C). Afecta a salmónidos silvestre y de cultivo, tanto en agua dulce como en ambiente marino. La enfermedad ocurre con mayor frecuencia en el riñón por su profunda vascularización y capacidad de filtrado, pudiendo llegar a crear un grave impacto económico (Roberts, 1981; Smith *et al.*, 2001; Ferguson, 2006).

2.6.2 Etiología

El BKD es causada por el agente infectocontagioso denominado *Renibacterium salmoninarum* (Sanders y Fryer, 1980; Ferguson, 2006).

2.6.2.1 Clasificación del Agente causal

Según Sanders y Fryer (1980), Stackebrandt *et al.* (1988), Stackebrandt *et al.* (1997) y OIE (2000) tenemos:

Phylum	:	Actinobacteria
Clase	:	Actinobacteriae
Orden	:	Actinomycetales
Familia	:	Micrococcaceae
Género	:	<i>Renibacterium</i>
Especie	:	<i>R. salmoninarum</i>

2.6.2.2 Morfología

El *Renibacterium salmoninarum* es un bacilo corto de 0.3-1.0 por 1.0 - 1.5 µm, gram positivo, ocurriendo a menudo en pares como diplobacilo, inmóvil, no esporulante, ni es ácido alcohol resistente (Sanders y Fryer, 1980; Fryer y Sanders, 1981; OIE, 2006).

2.6.3 Epidemiología

El primer reporte de BKD fue descrito en salmón silvestre del atlántico (*Salmo salar*) de los ríos Dee y Spey en Escocia a principios de los años 30 (Makie *et al.*, 1933), esta patología fue reportada por Belding y Merrill en EEUU en 1935 en trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*). El agente causal fue cultivado e inicialmente clasificado como *Corynebacterium sp.* (Ordal y Earp, 1956). En 1980, Sanders y Fryer lo clasifican como *Renibacterium salmoninarum*.

En Chile, la enfermedad se observó por primera vez en febrero de 1983 siendo considerada hasta finales de los 80, por lejos, la principal enfermedad que afectaba a los salmónidos cultivados en Chile. En algunos casos, las pérdidas por mortalidades atribuidas a BKD llegaban al 50% en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Lindbergh, 1993) y éstas eran incluso superiores en otras especies de salmónidos del Pacífico (*O. keta*) (Shimazu y Puchi, 1984). En Enero del 2007 cerca del uno por ciento de mortalidad por BKD de salmónidos según informaciones sanitarias de monitoreo de enfermedades por parte del INTESAL en Chile (Leal y Woywood, 2007).

La supervivencia del *R. salmoninarum* en agua es limitada, hasta algunas semanas, indicando que la bacteria es un patógeno obligatorio, en peces con la enfermedad clínica o en los peces portadores latentes (Evelyn, 1993).

BKD se ha descrito solamente en peces salmónidos aunque la propagación del *R. salmoninarum* se ha demostrado en otra especie de peces, como, ciprinidos (Sakai *et al.*, 1989), en el sablefish *Anoplopoma fimbria* (Bell *et al.*, 1990) y el molusco scallops japonés (*Patinopecten yessoensis*) (Sakai y Kobayashi, 1992). Se considera BKD como una enfermedad específica de salmónidos, aunque existen rarísimos hallazgos de la presencia de la bacteria, pero no de la enfermedad, en otro tipo de peces cuando han estado cohabitando con salmones infectados (Smith *et al.*, 2001; Eissa y Elsayed, 2006). Recientemente, el organismo ha sido aislado por primera vez en lamprea de mar (*Petromyzon marinus*), en el Lago Ontario (Eissa *et al.*, 2006).

En Chile, estudios sobre la prevalencia y el monitoreo de patologías como BKD en poblaciones de salmónidos son escasos, es así que, entre 1999 y 2001 se realizó un programa de monitoreo sanitario en los centros de producción de Chile en el cual se determinó en Truchas Arcoiris 8.7% positivos a Renibacteriosis (PROYECTO FIP, 2003). La primera identificación mediante inmunofluorescencia reportó 7% en Salmón Chinook juvenil (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Sanders y Barros, 1986), mientras que Núñez (1997) encontró mediante ELISA 18.2% de 11 Truchas Arcoiris. Según Smith *et al.* (2001) la prevalencia en hembras reproductoras en Chile es inferior al 5%. Se le atribuye un efecto inmunosupresor al *R. salmoninarum* favoreciendo la presentación de otras enfermedades (Larenas, 1999), es así que, Peters (2000) relaciona a BKD las alteraciones inflamatorias y circulatorias de sus resultados. Núñez (1997) reporta una prevalencia de 3.7% (15/403) de Leucemia Linfoblástica en salmónidos clínicamente enfermos con la que se asocia en un 26.7% (4/15) con BKD, mientras que Larenas *et al.* (1995) reporta en 40 salmónidos del atlántico mediante frotis directo de riñón teñido con Gram, escasa presencia de *R. salmoninarum*.

En Canadá entre los años 1992 a 1996 reportan prevalencias en Salmón chinook, que van desde 90% y bajo hasta 20% (VanderKooi y Maule, 1999), mientras que, en EEUU del año 2001 al 2004 se reportó en Truchas de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) 80% y se redujo hasta 43% respectivamente (Eissa *et al.*, 2006), lo que sugiere los importantes avances en la capacidad de diagnóstico y manejo sanitario especialmente en el reproductivo limitando la severidad de las infecciones de *R. salmoninarum* (Smith *et al.*, 2001; Eissa *et al.*, 2006).

Esta enfermedad es conocida en Japón, Norteamérica, Europa y Sudamérica. Es de curso muy lento, crónico, sistémico y a menudo fatal, que causa un severo debilitamiento de la condición del pez y afecta tanto a peces juveniles como adultos (Brown, 2000).

Algunos factores de riesgo para la presentación de la enfermedad son la temperatura, salinidad, dureza del agua, así como la dieta que se brinda a los peces (Fryer y Sanders, 1981; Bullock y Herman, 1988). Al aumento de la temperatura del agua (8-18 °C) la mortalidad se produce en forma masiva (Jansson, 2002).

2.6.3.1 Transmisión

Horizontalmente, por contacto con peces infectados (Bell *et al.*, 1984; Murray *et al.*, 1992), o por ingestión de vísceras que contengan el agente (Fryer y Sanders, 1981). Es posible que en la transmisión a través del agua contribuya la contaminación fecal por parte de los peces infectados (ruta orofecal) (Balfry *et al.*, 1996), así mismo, se informó de que *R. salmoninarum* se excreta en las heces de la trucha clínicamente enfermas, y que el organismo puede sobrevivir hasta 21 días en heces y sedimentos de estanque (Austin y Rayment, 1985) y más de una semana en agua de mar (OIE, 2000). No se descarta su transmisión vía branquial (Robohm y Koch, 1995; Smith, 2000), considerándose a esta como una bacteria que actúa lentamente en la invasión de los tejidos, así mismo, al no encontrarse en muestras de líquido de perfusión ni en el tejido branquial *in vitro* (Martínez, 1996; McIntosh *et al.*, 2000). La transmisión horizontal también se ha descrito en condiciones de campo donde salmónidos silvestres contagiaron a truchas cultivadas (Roberts y Shepherd, 1980; Mitchum y Sherman, 1981).

Verticalmente, de padres a la progenie, vía huevos. Las altas cantidades de *R. salmoninarum* en el líquido celómico son la fuente principal de la infección de los huevos, pues la bacteria es bastante pequeña es transmitida por el micrópilo en el huevo (Bullock *et al.*, 1978; Evelyn *et al.*, 1984; Evelyn *et al.*, 1986b) Esta enfermedad es una de las pocas que puede ser transmitida verticalmente (Bruno *et al.*, 1997), sin embargo, otros microorganismos, como *Flavobacterium psychrophilum* (Ekman *et al.*, 1999) y *Piscirickettsia salmonis* (Larenas *et al.*, 1999) también emplean este método de infección.

Se ha reportado en Chile que algunas enfermedades que afectan las poblaciones de peces podrían estar asociadas a la importación de ovas contaminadas con agentes patógenos a través de su transmisión vertical u horizontal, como BKD (Smith *et al.*, 2001), es así que, BKD presenta un aumento en el diagnóstico de peces positivos originados de ovas importadas, determinándose en truchas 8,7% (PROYECTO FIP, 2003).

2.6.3.2 Susceptibilidad

Una serie de observaciones indican que las especies de salmónidos pueden diferir en su susceptibilidad a BKD en infecciones experimentales (Suzumoto *et al.*, 1977; Winter *et al.*, 1980). Es así que dependen del hospedero o especie salmónida (Evenden *et al.*, 1993) y a virulencia de la cepa (Starliper *et al.*, 1997).

Los brotes naturales de BKD se presentan en forma exclusiva de salmónidos y dentro de éstos, los provenientes de la cuenca del océano Pacífico (género *Oncorhynchus*) son las más susceptibles (Smith *et al.*, 2001). Los salmones rosados (*O. gorbushca*), salmones del sockeye (*O. nerka*) y los salmones chinook (*O. tshawtscha*) son las especies más sensibles demostradas por infecciones más agresivas y con mortalidades más altas. Los salmones del atlántico (*Salmo salar*) y la trucha marrón (*Salmo trutta*) son bastante resistentes y la Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) se considera relativamente resistente (Sakai *et al.*, 1991; Dale *et al.*, 1997; Starliper *et al.*, 1997). Además, se reporta que la Trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) es más susceptible a la infección natural y experimental por *R. salmoninarum* que la Trucha Arcoiris, Trucha Marrón (*Salmo trutta*) y otros salmónidos (Belding y Merrill, 1935; Mitchum y Sherman, 1981; Eissa, 2005).

2.6.4 Signos clínicos

Los peces con infección grave por *R. salmoninarum* pueden carecer o manifestar signos externos (OIE, 2006), con la enfermedad raramente manifiesta hasta que el pez tiene 6–12 meses (Evelyn, 1993). Cuando se presenta un brote, los cambios de comportamiento pueden variar según la especie, edad y virulencia de las cepas de *R. salmoninarum*, afectando funciones de relación representados por movimiento errático, letargo y función de nutrición con pérdida de apetito (Fryer y Sanders, 1981; Evenden *et al.*, 1993).

2.6.5 Lesiones

2.6.5.1 Macroscópicas

Externamente, los peces pueden presentar las siguientes alteraciones: oscurecimiento de la piel especialmente de la zona dorsal, exoftalmia, distensión abdominal, petequias en la base de las aletas pectorales, formaciones vesiculares con contenido sanguinolento (especialmente en reproductores) y/o úlceras en la piel (Evelyn *et al.*, 1998).

Internamente, es probable que se aprecien, con diferentes grados de intensidad, las siguientes alteraciones morfológicas: branquias pálidas, granulomas grisáceos-blanquecinos de tamaño variable en el riñón, que también pueden observarse en hígado, bazo y en casos extremos eventualmente en cualquier órgano, aumento de volumen de riñón y bazo, presencia de fluido serosanguinolento u opaco en la cavidad visceral, focos hemorrágicos en hígado, intestino, grasa pilórica y musculatura (Evelyn *et al.*, 1998), formación de cavidades en tejido muscular en enfermedad crónica prolongada (Wolke, 1975) y de una pseudomembrana que puede cubrir distintos órganos de la cavidad celómica (Smith, 1964; Bruno, 1986; Evelyn *et al.*, 1998). En ocasiones la infección a temperaturas más bajas se acompañan de perinefritis, periesplenitis, perihepatitis y pericarditis (Ferguson, 2006). En el curso de enfermedad clínica en el pez, los agentes de las grandes infecciones se encuentran por orden de frecuencia decreciente en el riñón, el bazo, el encéfalo, el intestino, la sangre (muestras cardíacas) y el hígado (De Kinkelin *et al.*, 1991).

2.6.5.2 Microscópicas

El estudio histopatológico del riñón, es indispensable y siempre debe formar parte de los muestreos realizados para diagnosticar las causas de enfermedades en los peces (De Kinkelin *et al.*, 1991), ya que este órgano es blanco de muchas enfermedades de interés económico como BKD, Piscirickettsiosis (SRS) y Leucemia Linfoblástica (LL) (Bruno, 1986; Suárez, 1997).

La principal lesión histopatológica corresponde a una respuesta granulomatosa crónica que afecta principalmente a los tejidos del riñón y en menor medida el hígado y el bazo (Jansson, 2002; Eissa y Elsayed, 2006, Ferguson, 2006). Las inflamaciones crónicas en peces son caracterizadas por una cantidad creciente de melanomacrófagos y de melanina dispersa (Bruno, 1986). Las necrosis focales están rodeadas por tejido granulomatoso de células epitelioides y células linfoides, con diversos grados de encapsulamiento (Jansson, 2002).

Los granulomas se forman como resultado de la activación de los macrófagos seguido de su adhesión a otros que forman aspecto epitelioides y luego algunos de estos fundirse para formar células multinucleadas y células gigantes (Secombes, 1985). Células multinucleadas y macrófagos activados liberan grandes cantidades de enzimas líticas en los tejidos circundantes conduce a la necrosis en la parte central del granuloma (Bruno, 1986; Jansson, 2002). Las bacterias pueden estar intracelularmente o extracelularmente en asociación con los granulomas o focos necróticos (Bruno, 1986; Jansson, 2002).

Las lesiones granulomatosas surgen en el estroma de tejido conectivo entre las células del parénquima, así mismo, el tejido hematopoyético de la parte anterior del riñón es afectado inicialmente, seguido de grandes daños del tejido excretor de los riñones (Jansson, 2002).

Los glomérulos se ven afectados con engrosamiento de su membrana basal y oclusión de la capsula de Bowman por contenido filamentoso o material granular (Sami *et al.*, 1992), ocasionando gránulos eosinofílicos en los túbulos proximales (Young y Chapman, 1978, Ferguson, 2006).

2.6.6 Patogenicidad

2.6.6.1 Factores de virulencia

El *R. salmoninarum* ocasiona generalmente un cuadro clínico sistémico crónico, lento y progresivo (Evelyn, 1993), lo cual es consistente con el hecho de que no se han

detectado toxinas de efecto letal agudo en esta bacteria. Sin embargo, produce la proteína hidrofóbica de superficie celular, de 57 kDa conocida como p57 (antígeno F) (Getchell *et al.*, 1985), codificado por el gen *msa* (principales o mayores antígenos solubles) (Chien *et al.*, 1992). Esta proteína p57 parece ser un factor de virulencia importante, ya que suprime la producción de anticuerpos *in vitro* y, además parece inducir una tolerancia inmunológica *in vivo* (Turaga *et al.*, 1987; O'Farrel *et al.*, 1999). Sin embargo la represión también fue atribuida a la proteína p57, pero también a una proteína de superficie de 22 kDa (Fredriksen *et al.*, 1997).

La proteína p57 presenta propiedades hemoaglutinantes (Daly y Stevenson, 1990) y leucoaglutinantes (Wiens y Kaattari, 1991). La actividad hemolítica se atribuye a un polipéptido de 65 kDa y el gen fue designado como *hly* (Grayson *et al.*, 1995). La actividad proteolítica es originada por una proteasa de 100 kDa derivada de la proteína p57 (Rockey *et al.*, 1991; Barton *et al.*, 1997).

Se ha descrito en Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) y salmón chinook (*O. tshawtscha*) una cepa de *R. salmoninarum* con bajos niveles de la proteína p57 en la superficie celular bacteriana, denominada MT239. Esta cepa tiene una baja virulencia en comparación con otras, como la ATCC 33209, que expresa concentraciones mayores de dicho antígeno (Bruno, 1990; O'Farrell *et al.*, 1999; O'Farrel y Strom, 1999; O'Farrell *et al.*, 2000). Hamel (2001) concluye que las cepas difieren en su patogenicidad por que existe una correlación positiva a la cantidad de p57 asociados a la superficie bacteriana.

La pared celular de *R. salmoninarum* contribuye a la supervivencia bacteriana en el fagocito mononuclear, por lo tanto, constituye un factor de virulencia (Gutenberger *et al.*, 1997). El peptidoglicano covalente ligado al polisacárido fue sugerido para explicar la fuerza rígida de la pared de la célula del *R. salmoninarum* ante las lisosimas (Kusser y Fiedler, 1983; Jansson, 2002). Por microscopia electrónica se ha revelado que *R. salmoninarum* se encapsula (Dubreuil *et al.*, 1990) Aunque su papel en la patogénesis de BKD no está determinado, la presencia de una cápsula en otros patógenos bacterianos contribuye a su virulencia (Couch y Fournie, 1993).

2.6.6.2 Patogenia

Aunque los mecanismos y factores que intervienen en la patogénesis de la enfermedad no está bien descrito debido a las diferencias en susceptibilidad entre las especies de salmónidos (Jansson, 2002), pero hay varios caracteres de *R. salmoninarum* que puedan contribuir a su virulencia (Couch y Fournie, 1993; Lim y Webster, 2001; Jansson, 2002). Respecto a la ruta de ingreso que emplea *R. salmoninarum* para acceder a los tejidos internos se realiza por vía gastrointestinal a través de alimentos con materiales infectados con esta bacteria (Fryer y Sanders, 1981). Una vez superada las barreras superficiales, *R. salmoninarum* tiene la capacidad de inducir su absorción por parte de células no fagocíticas y pueden sobrevivir a la ingestión. Esto proporciona un medio de entrada en el hospedero a través del tracto gastrointestinal. *R. salmoninarum* puede evadir la respuesta inmune del hospedero y multiplicarse intracelularmente en los fagocitos (principalmente), así como en células no fagocíticas (Bruno, 1986; Gutenberger *et al.* 1997), y parece capaz de sobrevivir a bajas concentraciones dentro de los peces durante su ciclo de vida. Esta bacteria puede llegar a concentraciones de 10^9 células/g en los tejidos de riñón y bazo antes del inicio de la muerte de los peces (Evelyn, 1996). La diseminación de ella ocurre a través de la circulación sanguínea en forma libre y también intracelularmente incorporada principalmente en monocitos. El éxito de diseminación del proceso infeccioso es atribuido a la pared celular de la bacteria que le confiere resistencia a la acción fagocítica y a la proteína de superficie p57 suprimiendo la producción de anticuerpos (Gutenberger *et al.*, 1997; Smith, 2000).

El tejido hematopoyético de la parte anterior del riñón es afectado inicialmente, seguido de grandes daños al cuerpo renal conformado principalmente por tejido excretor y parte del hematopoyético (Jansson, 2002). Esta bacteria ocasiona generalmente un cuadro clínico crónico asociado a sus factores de virulencia. Se ha descrito la presencia de cepas de baja virulencia con concentraciones menores de p57 (O'Farrel y Strom, 1999; O'Farrel *et al.*, 2000), afectando principalmente al riñón, por su profunda vascularización y capacidad de filtrado (Noga, 2000; Ferguson, 2006), pudiendo presentarse también en otros órganos como bazo e hígado (Noga, 2000; OIE, 2000; Ferguson, 2006).

Existen evidencias que los daños renales son consecuencia de depósito de complejos inmunes, básicamente formados por anticuerpos ligados a la proteína p57, que ocasionaría glomerulonefritis (Sami *et al.*, 1992; Flaño *et al.*, 1996; Kaattari y Piganelli, 1997; Kaattari, 2000, Jansson, 2002).

La respuesta por parte del hospedero progresa de manera discreta, formando granulomas rodeado de células epitelioides y células linfoides que luego se amplia masivamente (Esmith *et al.*, 2001; Jansson, 2002) además la presencia de células gigantes (Secombes, 1985) y aumento de centros melanomacrófagos (Bruno ,1986). La ruptura de la capsula renal ocasiona peritonitis. A temperaturas bajas, por debajo de 9 °C, se acompaña de pseudomembranas de fibrina y leucocitos alrededor de órganos internos (Smith, 1964; Ferguson, 2006), usualmente una encapsulación más pronunciada de las lesiones en especies resistentes (Belding y Cerril, 1935; Evelyn, 1993) y a temperaturas superiores las lesiones son de naturaleza necrótica (Smith, 1964). La enfermedad clínica se desarrolla durante los momentos de estrés (Noga, 2000) para que se presenten los primeros signos clínicos de la enfermedad ocasionando infección renal, septicemia y muerte del pez afectado (Zarzuelo, 1981; Bruno *et al.*, 1997).

2.6.7 Diagnóstico de la enfermedad

Se basa en antecedentes anamnésicos, patología macroscópica, contando con el apoyo del laboratorio para observar lesiones en los tejidos y confirmar la presencia de la bacteria (Smith *et al.*, 2001). Siendo el riñón el principal blanco y de mayor frecuencia a BKD, resulta ser el mejor órgano para el muestreo durante las epidemias (Noga, 2000, Smith *et al.*, 2001).

El aislamiento bacteriano sigue siendo el método de prueba patrón para determinar la viabilidad del *R. salmoninarum* de una muestra, para lo cual, se necesita de 3 a 6 semanas, en la práctica no es posible usarlo en forma rutinaria (Noga, 2000, Smith, *et al.*, 2001), sin embargo los procedimientos inmunodiagnósticos se han convertido en los más ampliamente utilizados. La detección del antígeno en los tejidos infectados es un procedimiento más rápido. Los dos métodos inmunodiagnósticos principales son la

prueba inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la prueba directa e indirecta de anticuerpos fluorescentes (DFAT e IFI). Las pruebas diagnosticas basadas en ácidos nucleicos, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son aceptables ahora para la identificación confirmativa del *R. salmoninarum* en cultivos bacteriológicos, muestras de tejido lesionado o muestras bacteriológicas de fluido corporal. A medida que se ha desarrollado una prueba nueva, ha habido una cierta tendencia a abandonar las técnicas anteriores. Sin embargo, no se ha desarrollado todavía una única prueba ideal para detectar la presencia de *R. salmoninarum* en múltiples muestras (OIE, 2006).

El primer reporte de BKD en Chile, mediante inmunofluorescencia (DFAT) en tejido renal de salmónidos, lo realizaron Sanders y Barros (1986). Se ha demostrado que al aumentar el número de capas, aumenta el número de sitios de unión específicos, de modo que en IFI la fluorescencia es considerablemente más brillante y, por tanto, mayor sensibilidad en comparación con un DFAT (Tizard, 1998; Roitt, 2003; OIE, 2006).

Se ha utilizado modificaciones el método de Bullock y Stuckey (1975b) para la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), en la detección de BKD. Se reportan casos determinados mediante IFI, en que los salmónidos analizados no mostraron signos clínicos (Bullock y Stuckey, 1975b; Sakai *et al.*, 1992), es así, que se determinó en Canadá infecciones asintomáticas en salmón del atlántico (*Salmo salar*) de 33,4% de 456 juveniles y 35,1% de 37 adultos (Paterson *et al.*, 1979), mientras que, de 200 hembras grávidas resulto 12% (24/200) tejido renal y 7,5% (15/200) fluido ovárico (Griffiths *et al.*, 1996).

Realizando pruebas de rutina en tejido renal mediante IFI en 80 salmónes coho de desove resultaron positivas 12,5%, pero el 45% positivos por PCR. Por lo tanto, PCR confirma la determinación de portadores sugerida por IFI que proporcionando suficiente discriminación a ser útil para la supervisión (Stevenson, 1999).

Se reporta en Chile, el uso de IFI en determinación de otras enfermedades como *Piscirickettsia Salmonis* (SRS) en ovas de Truchas Arcoiris y heces de alevinos (*Oncorhynchus mykiss*) (Larenas *et al.*, 2003; Larenas *et al.*, 2005), Leucemia linfoblástica en *O. kisutch*, *O. mykiss* y *S. salar* (Núñez, 1997).

2.6.7.1 Diagnóstico diferencial

En relación a las lesiones nodulares granulomatosas, se debe tener en cuenta que este tipo de alteraciones pueden ser generadas por otros microorganismos, ya sean bacterianos (*Mycobacterium spp*, *Nocardia spp*), micóticos (*Ichthyophonus hoferi*, *Exophiala salmonis*) o parasitarios (Enfermedad Proliferativa del Riñón, *Ceratomyxa shasta*, metazoos enquistados) e incluso como reacción a materiales extraños particulados (Ej. componentes oleosos de los adyuvantes de las vacunas) en salmones (Smith *et al.*, 2001).

En todas estas enfermedades, es sobre todo la morfología y las propiedades tintoriales de las bacterias presentes en los focos lesionales que permiten una orientación más segura en el diagnóstico. Coloración Gram (Renibacteriosis), Tinción de Ziehl Nielsen - ácido alcohol resistentes (Tuberculosis), formaciones pseudomiceliales (*Nocardia*), coloración Hematoxilina y Eosina (espora de *Ichthyophonus hoferi*) (De Kinkelin *et al.*, 1991).

Se debe diferenciar de otros bacilos Gram positivos especialmente *Carnobacterium piscicola*, *Lactococcus piscium* y *Vagococcus salmoninarum*. Estas tres especies tienen gran similitud entre sus patrones bioquímicos, originalmente se les clasificó como lactobacilos y se les asoció como agentes causales de la «pseudoenfermedad del riñón». Son básicamente bacterias oportunistas y tienen una baja virulencia. La diferenciación se basa principalmente en la observación y detección del organismo o de sus antígenos mediante Inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA y PCR (Eissa y Elsayed, 2006).

Por otra parte, en peces dulceacuícolas expuestos a niveles superiores a 5mg/l de dióxido de carbono y una dieta baja en minerales con menos de 0.1% de magnesio, se produce una deposición de sales cálcicas en los uréteres, lo que origina nefrocalcinosis, respuesta granulomatosa de textura arenosa (Peddie, 2004) o urolitiasis, donde se producen lesiones renales, que a nivel macroscópico podrían confundirse también con BKD (Smith *et al.*, 2001; Ferguson, 2006).

2.6.7.2 Confirmación del diagnóstico

El diagnóstico de BKD se debe basar en ELISA, IFI y DFAT. La confirmación del *R. salmoninarum* se debe hacer PCR o por cultivo bacteriológico en medio especializado de la enfermedad del riñón (OIE, 2006) KDM-2 (Evelyn, 1977), KDM-C (Daly and Stevenson, 1985) o SKDM-2 (Austin *et al.*, 1983).

2.6.8 Prevención y control

2.6.8.1 Prevención

Debido a las dificultades con los tratamientos, la mejor manera de enfrentar esta enfermedad es mediante la implantación de medidas preventivas. Una estrategia para evitar la transmisión horizontal es utilizar fuentes de agua donde no existan poblaciones silvestres de salmónidos y evitar usar el agua provenientes de otras piscifactorías cercanas (Smith *et al.*, 2001). Tomar medidas sanitarias de manejo, descanso, desinfección de materiales e instalaciones con soluciones yodadas (150 mg/L), maniluvios, pediluvios y rodoluvios (300 mg/L) para evitar la diseminación de la bacteria dentro del cultivo intensivo de peces (Enriquez *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001).

Se ha logrado inactivar la bacteria con uso de cloro, donde lo importante es el tiempo de exposición (Pascho *et al.*, 1995; Pascho y Ongerth, 2000), se recomienda en desinfección de estanques, vías de flujo y materiales de trabajo a 40 mg/L por 30 minutos o para pediluvios y rodoluvios con 1000 mg/L (Enriquez *et al.*, 2000).

Los especímenes con los que se inicia el ciclo de la crianza, ovas o alevinos deben provenir de reproductores examinados y que hayan resultado libres de la infección de esta bacteria (Evelyn, 1986).

En las últimas décadas, la vacunación contra BKD ha alcanzado distintos niveles de éxito y progresos limitados (OIE, 2000; Jansson, 2002; Smith *et al.*, 2001; Eissa y Elsayed, 2006). Se encontró que aunque se genere anticuerpos específicos en los peces, estos no se relacionan con inmunoprotección contra la enfermedad (Evelyn, 1993; Sakai

et al., 1995). Sin embargo al administrar antígenos sin la proteína p57, por vía oral se genera una respuesta inmune efectiva (Piganelli *et al.*, 1999; Kaattari, 2000).

2.6.8.2 Control

2.6.8.2.1 Quimioterapia

El tratamiento con antibióticos sólo tiene efecto temporal, no elimina completamente la bacteria. La falta de la eficiencia terapéutica se atribuye a la supervivencia intracelular de *R. salmoninarum*, sin embargo, las mortalidades ocasionadas en un brote de BKD en salmónidos pueden ser disminuidas significativamente empleando algunos antimicrobianos (Freyer y Sanders, 1981), como el empleo de Eritromicina en alimento para juveniles 100-200 mg/kg por 21 días, evitando perjudicar la palatabilidad (Wolf y Dunbar, 1959; Austin, 1985, Moffit, 1992), desinfección de ovas con solución yodada (100 mg/L) por 10-15 minutos (Fryer, 1989; Enriquez *et al*, 2000), o en hembras reproductoras 11-20 mg/kg via subcutanea 30-60 días antes del desove reduciendo la transmisión de *R. salmoninarum* a los huevos (Klontz, 1983; Evelyn *et al*, 1986a; Moffitt, 1991).

Tratamientos vía oral por 10 días en juveniles (Austin, 1985), otro estratégico no terapéutico en alevinos por corto tiempo después que estos inician su primera alimentación (Evelyn, 1993) y la Inyección en las hembras reproductoras 20 mg/kg durante 9 días antes del desove (Armstrong *et al.*, 1989). Estas medidas persiguen disminuir la tasa de infección a un mínimo, con un bajo costo debido al menor volumen de antibiótico usado y además evitar el riesgo de producir daño de la función renal en los peces sometidos a estos tratamientos tan prolongados (Hicks y Geraci, 1984; Evelyn, 1993).

Otra alternativa terapéutica en Truchas Arcoiris para el control de la infección de BKD es la utilización de enrofloxacin a una dosis de 1.25-2.5 mg/kg durante 10 días (Hsu *et al.*, 1994). Así mismo, la eritromicina (tiocianato y fosfato), penicilina G sódica, clindamicina, kitasamycin y espiramicina redujeron efectivamente la mortalidad temprana en casos clínicos de BKD. Además, cephradine, lincomicina, y rifampicina

fueron eficaces para la quimioprofilaxis de BKD, pero fueron ineficaces para la terapia (Austin, 1985).

Como estrategia para atenuar el estrés crónico originado por estrés oxidativo y por densidades altas en cultivo intensivo que originan la disminución de la acción inmunitaria, asimismo, susceptibiliza a los peces ante la infección y presentación de BKD, se recomienda monitorear el suplemento de Yodo, Fluor, Magnesio, ácidos grasos esenciales (AGE: Omega 3 y omega 6), vitaminas E y C en las dietas (Lall *et al.*, 1985; De Kinkelin *et al.*, 1991; Trenzadero, 2004).

2.6.8.2.2 Segregación de adultos

Regularmente los programas de cribado (screening) para prevenir transmisión horizontal entre ovas y alevinos, así como la transmisión vertical del BKD ha sido la más importante posibilidad de control (Elliott *et al.*, 1989; Fryer y Lannan, 1993). El sacrificio de las crías, la destrucción de ovas procedentes de hembras reproductoras positivas a BKD, se ha demostrado para reducir la prevalencia de la enfermedad (Elliott *et al.*, 1995; Gudmundsdottir *et al.*, 2000). Esto requiere una técnica rápida, específica y sensible para la identificación de los portadores, y una cuidadosa separación de los huevos hasta que el diagnóstico sea establecido (Jansson, 2002). Los métodos mas empleados son pruebas de inmunofluorescencia, directa o indirecta (Bullock *et al.*, 1980; Laidler, 1980) y de ELISA, con el propósito de detectar la presencia de la bacteria desde tejido renal o fluido celómico (Pascho y Mulcahy, 1987; Lee y Evelyn, 1989), como también PCR para fluidos de ovario (Miriam *et al.* 1997). Los avances en el control de BKD dependen de una comprensión de la patogénesis de BKD y el conocimiento de funciones de base inmune en los peces (OIE, 2006).

2.6.8.2.3 Erradicación

Destrucción completa de las poblaciones infectadas y desinfección de las instalaciones de la explotación para lograr la erradicación completa de la enfermedad. Sin embargo, este procedimiento es considerado impracticable (Sanders y Fryer, 1980).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El muestreo del presente estudio se realizó en una piscigranja ubicada en el distrito de Ingenio, Provincia de Huancayo, Región Junín, a una altitud de 3540 msnm., durante el mes de Febrero del 2007, correspondiendo a la época de lluvias con temperaturas ambientales entre 10-18°C, temperatura promedio del agua de cultivo de 10.8°C, Oxígeno disuelto de 7.5 mg/L evaluado por la piscifactoría en estudio y un pH de 7.3. Así mismo, la fuente de agua proviene del Río Chiapuquio que en invierno tiene un caudal de 2500 L/seg y en seca de 750 L/seg. El ciclo de producción intensiva es completo, contando con sala de incubación, estanques de alevinaje, juveniles, precomerciales (engorde) y comerciales (acabado). Sus instalaciones son estanques de concreto construidos con el sistema americano. La producción total de trucha asciende entre 150-200 TM por año, siendo el principal mercado local.

3.2 Tamaño de muestra

Se utilizó el Teorema de Límite Central, el cual nos indica que el tamaño muestral de 30 se considera como la cantidad mínima significativa (Spiegel, 1991; Wayne, 1996). Sin embargo, el tamaño total de la muestra fue de 33 truchas.

Las truchas se seleccionaron de los 13 estanques correspondientes a la fase de precomerciales. Esta selección se realizó tomando en cuenta la población total de los 13

estanques y la población de cada estanque seleccionado. Mediante una regla de tres simple se obtuvo el número de truchas muestreadas por estanque.

3.3 Características de la muestra

Se muestrearon Truchas Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en fase precomercial de ocho a nueve meses, cultivadas en estanque de concreto. Estas procedieron de ovas de reproductores nacionales. Los peces sacrificados fueron pesados y medidos para así obtener sus promedios.

3.4 Materiales

Los materiales utilizados para la colecta de peces, necropsia, histopatología e inmunofluorescencia indirecta fueron aportados por la piscigranja en estudio, Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria (sección virología) ambos de la FMV-UNMSM, y recursos propios (Anexo A3).

3.5 Métodos

3.5.1 Obtención de muestra

En las mañanas se identificó las pozas de truchas precomerciales, colectando los peces con signos de enfermedad o moribundos. Las truchas fueron sacrificadas mediante la técnica de corte medular con tijera, entre el cerebro y medula espinal (Roberts and Shepherd, 1980; Rosenthal, 2007). La inspección, colección y conservación de las muestras se realizaron el mismo día.

Una vez obtenido e identificado el pez, se tomó la talla, peso y se efectuó un cuidadoso examen de la superficie corporal anotándose la presencia de anomalías visibles macroscópicamente. Se evaluó la homogeneidad de la piel, erosiones y posible presencia de exoftalmia, luego se desinfectó la superficie del pez con alcohol de 70°.

El proceso de necropsia se llevó a cabo mediante la metodología recomendada por y Reimschuessel *et al.* (1992) y Ostrander (2000), dejando expuestas *in situ* las vísceras. Una vez expuestas las branquias y la cavidad celómica, se procedió a efectuar un examen macroscópico de órganos internos para determinar y anotar alguna anormalidad o lesión tomando especial interés en el riñón.

3.5.1.1 Obtención de muestras para inmunofluorescencia

Se tomaron pequeños cortes de tejido renal 5-10 mm. de longitud de las muestras de riñón, los cuales fueron colocados inmediatamente en bolsas plásticas, rotulados para su conservación en frío (0°C) para realizar improntas y su posterior análisis de inmunofluorescencia indirecta en el laboratorio.

3.5.1.2 Obtención de muestras para histopatología

Se tomó pequeños cortes de tejido renal de la región anterior y posterior, hígado, bazo y branquias, de 5-10 mm. de longitud, los cuales fueron fijados inmediatamente en pequeños frascos con formol tamponado al 10% para su posterior análisis en el laboratorio.

3.5.2 Procesamiento de las muestras

3.5.2.1 Inmunofluorescencia indirecta

El proceso y lectura se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria (sección virología) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayo de San Marcos. Las muestras fueron procesadas según las recomendaciones del Kit para detección de *Renibacterium salmoninarum* de “BIOS Chile” de la siguiente manera:

- Los anticuerpos monoclonales utilizados son específicos para *R. salmoninarum* ATCC y para 4 aislados obtenidos de diferentes centros de cultivo del Chile.
- Las improntas se fijaron por 10 minutos en Xilol frío (-20°C).

- Se agregó sobre cada frotis 10 µL del reactivo oligoclonal Anticuerpo anti *Renibacterium salmoninarum* del Kit, previamente diluido 1:100 con la solución de dilución, cubriendo toda la superficie de la muestra e incubar los portaobjetos por 30 minutos en una cámara húmeda y cerrada en oscuridad a 37°C.
- Se lavó los portaobjetos con la solución de lavado previamente diluida 1:25 con agua destilada y se dejó reposar tres minutos en el coplin, repitiendo el procedimiento de lavado una segunda vez por un minuto. Removiendo los portaobjetos del recipiente y eliminando el exceso de solución evitando que el tejido se seque.
- Se agregó sobre cada muestra 10 µL de anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Fluoresceína isotiocianato), previamente diluido 1:100 con la solución de dilución e incubar los portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda y cerrada en oscuridad a 37°C.
- Se repitió el procedimiento de lavado descrito como en el caso del oligoclonal.
- Se agregó 10 a 20 µL de solución de montaje de pH 9, se cubrió la muestra con un cubreobjeto evitándose la formación de burbujas. Las muestras se examinaron en el microscopio de fluorescencia con un aumento de 1000X e inmersión, realizándose el diagnóstico (Anexo A1).
- Se consideró un control positivo de una lamina fijada en acetona con la cepa Rs4/86 donado por la SVA: Statens Veterinärmedicinska Anstalt, departament of wildlife, fish and enviroment. Section of fish. Suecia, el cual se esquematiza en la figura 1.
- Se consideró positivo (+) cuando se observó al microscopio de fluorescencia con un aumento de 1000x e inmersión, la presencia de bacterias fluorescentes y con características compatibles (diplobacilos forma de “v”, cocobacilo forma de pera) con *Renibacterium salmoninarum* por lo menos en 5 y máximo 100 campos de observación, examinados en la ampliación 1000x.
- Se consideró negativo (-) cuando la muestra no tenia ninguna fluorescencia (Bios Chile, 2000; OIE, 2006).

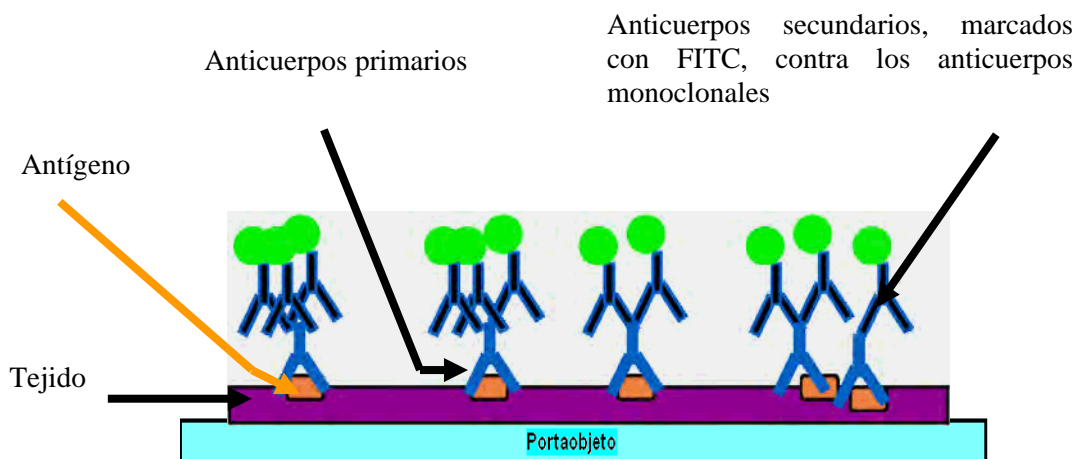


Figura 1. Fluorescencia positiva: Tejido renal presenta fluorescencia asociada a las bacterias (Adaptado de CEFAS 2007)

3.5.2.2 Histopatología

Las muestras fijadas y reducidas fueron sometidas a deshidratación por diversos grados de alcohol en concentraciones crecientes (80°, 90° y 100°); aclaración en Xilol; e inclusión en parafina, para posteriormente obtener los cortes con ayuda de un micrótopo, en secciones de 3-5 micras de espesor (Anexo A2) y ser coloreadas con Hematoxilina-Eosina (H-E) según el protocolo de trabajo (Anexo A4).

Las láminas obtenidas fueron observadas con un microscopio óptico de luz con aumentos de 50x, 100x y 400x para la determinación de lesiones e interpretadas en el Laboratorio de Histología, Embriología, y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.5.2.2.1 Clasificación de lesiones histopatológicas

Los grados (I al IV) y clasificación de lesiones (degenerativas, necróticas, inflamatorias, circulatorias, crecimiento y regenerativas) encontrados a la microscopía están adaptados de la técnica propuesta por Reimschuessel *et al.*, (1992) basadas en la extensión del tejido renal afectado. Modificado por el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Ramos, 2007), tal como se muestra en el cuadro 4:

Cuadro 4. Valores establecidos por la severidad de acuerdo a la extensión del tejido afectado

Grado	Extensión
I	Escasa presencia de la lesión, multifocal, hasta 25% aproximadamente de toda la muestra.
II	Leve presencia de la lesión, multifocal, del 25% hasta 50% aproximadamente de toda la muestra.
III	Moderada presencia de la lesión, difuso, del 50% hasta 75% aproximadamente de toda la muestra.
IV	Severa presencia de la lesión, difuso, del 75% hasta aproximadamente el 100% de la muestra.

Fuente: Adaptado de Reimschuessel *et al.* (1992)

Para el caso de lesiones hepáticas de degeneración grasa se adaptó de la técnica propuesta por Bernet *et al.*, (1999). Modificado por el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Rosenthal, 2007) (Cuadro A8).

3.6 Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los resultados de la caracterización anatomohistopatológica se utilizó un análisis de frecuencia, indicando el porcentaje de cada variable con respecto al total de la población analizada para cada análisis.

La frecuencia fue determinada mediante la fórmula:

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

Donde (X) representa = Alteraciones clínicas, lesiones renales macroscópicas externas e internas, resultados IFI de muestras renales, lesiones microscópicas determinadas por histopatología.

Los resultados microscópicos de lesiones en la extensión de tejidos, se presentaron en una escala de grados que va de 1-4 descrita anteriormente, con la finalidad de hacer una evaluación más objetiva.

IV. RESULTADOS

Las muestras empleadas en el presente estudio provienen de 33 Truchas Arcoiris (*Oncorhynchus mikiss*) de fase precomercial (8-9 meses) con un peso y talla promedio de 145g. y 22cm. respectivamente (Cuadro A2). Todos los peces muestreados presentaron uno o más signos de aparente enfermedad, tales como letargia, poca movilidad, oscurecimiento de piel, cambio de comportamiento, nado errático u orillado, exoftalmia, entre otros (Cuadro A1).

4.1 Estudio clínico y lesiones macroscópicas

Al examen externo de las Truchas Arcoiris clínicamente enfermas, se pudo determinar diferentes tipos de características clínicas y lesiones, representadas mayormente por melanosis parcial de la piel (Fig. 2) con 87.9% (29/33), nado lento y superficial 57.6% (19/33), palidez branquial de 51.5% (17/33) y pez en el fondo 36.4% (12/33) (Fig. 3) (Cuadro A1).

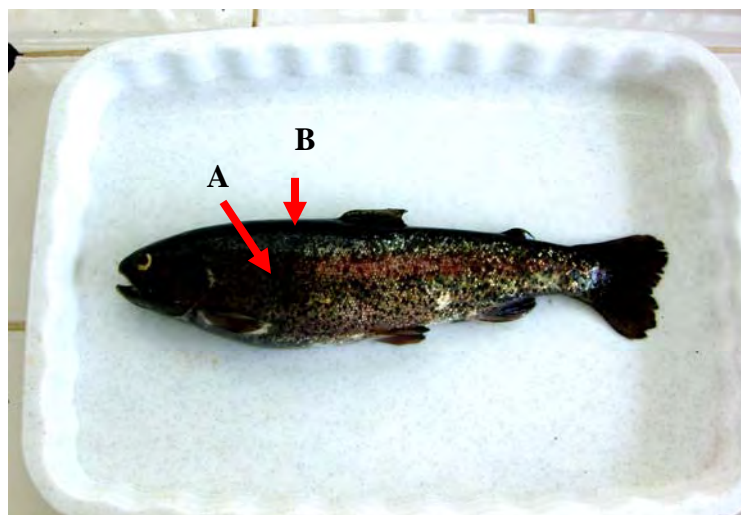


Figura 2. Melanosis parcial de Trucha Arcoiris: (A) Zona pectoral. (B) Zona dorsal

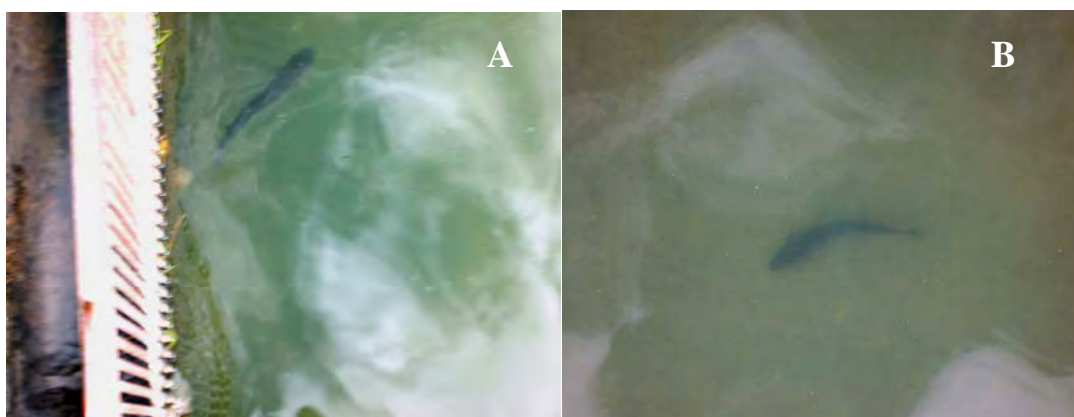


Figura 3. Signos clínicos de Truchas Arcoiris: (A) Nado lento y superficial cerca de la reja de salida de agua. (B) Pez en el fondo de la poza

A la necropsia, se evidenció esplenomegalia, renomegalia con granulomas blanquecinos de variados tamaños (0.1 a 0.6 cm), que fueron observados también en hígados.

Las lesiones macroscópicas de la cabeza y cuerpo renal (Fig. 4) representó el 36.4% (12/33). Los riñones se caracterizaron por estar pulposo, dilatados, de color rojo oscuro, de apariencia congestionada sobresaliendo a la cavidad celómica (Fig. 4). Se evidenciaron riñones con puntos blanquecinos compatibles con granulomas (Fig. 4) (Cuadro 6).

Otras lesiones macroscópicas a la necropsia fueron las encontradas en los hígados 78.7% (26/33) caracterizados por palidez hepática y granulomas (Fig. 4). El bazo con 96.9% (32/33) principalmente presento esplenomegalia y congestión (Fig. 4) (Cuadro 5).

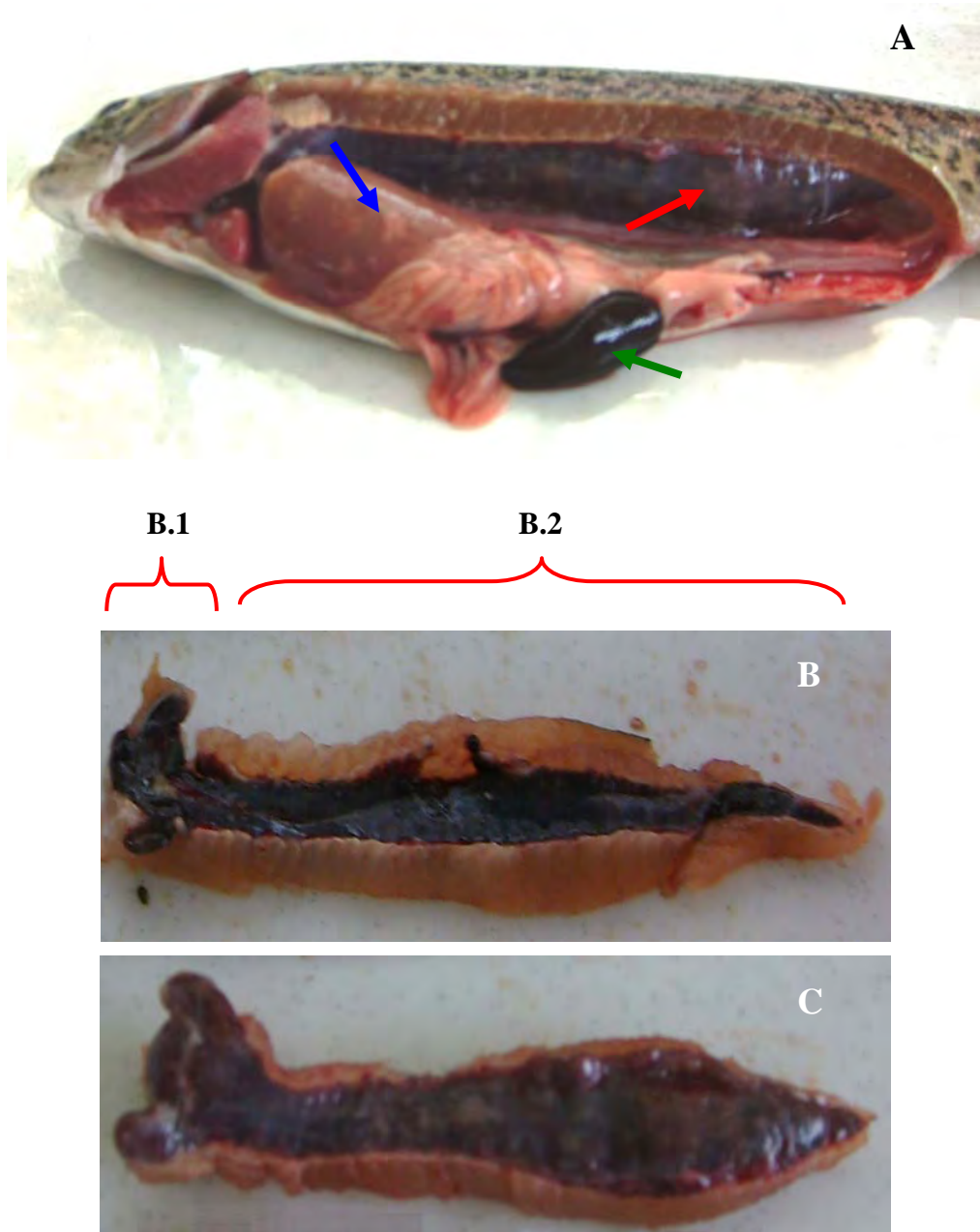


Figura 4. Riñones de Truchas Arcoiris. (A) Riñón pulposo y con granulomas (Flecha roja), granuloma hepático (Flecha azul), esplenomegalia y congestión (Flecha verde). (B) Riñón aparentemente normal. Partes anatómicas renales; (B.1) Cabeza renal, (B.2) Cuerpo renal. (C) Riñón totalmente pulposo

Cuadro 5. Frecuencia de las alteraciones macroscópicas observadas en riñones, hígados y bazos de Truchas Arcoiris

Alteraciones macroscópicas de órganos internos			
Órgano	Alteraciones	Total	%
Riñón	Cuerpo renal pulposo	5/33	15.2
	Ambas porciones renales pulposas + granulomas	3/33	9.1
	Cuerpo renal pulposo + granulomas	2/33	6.1
	Ambas porciones renales pulposas y cuerpo renal con granulomas	1/33	3
	Ambas porciones renales pulposas + granulomas y cuerpo renal protuye de capsula renal	1/33	3
	Total	12/33	36.4
Hígado	Palidez hepática	18/33	54.5
	Palidez hepática + Granulomas	4/33	12.1
	Granulomas	2/33	6.1
	Palidez hepática + Adherencia	1/33	3.0
	Palidez hepática + Granulomas + Adherencia	1/33	3.0
	Total	26/33	78.7
Bazo	Esplenomegalia + Congestión	22/33	66.6
	Esplenomegalia	7/33	21.2
	Esplenomegalia + Congestión + Consistencia deleznable	2/33	6.1
	Congestión	1/33	3.0
	Total	32/33	96.9

4.2 Estudio renal mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

El control positivo, presentó innumerables bacterias que emitían luz fluorescente (Fig.5A). Se detectó antígeno de *Renibacterium salmoninarum* (Fig. 5B, C, D) en una frecuencia del 15.2% (5/33), al realizarse la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) a los tejidos renales de peces clínicamente enfermos (Cuadro 6).

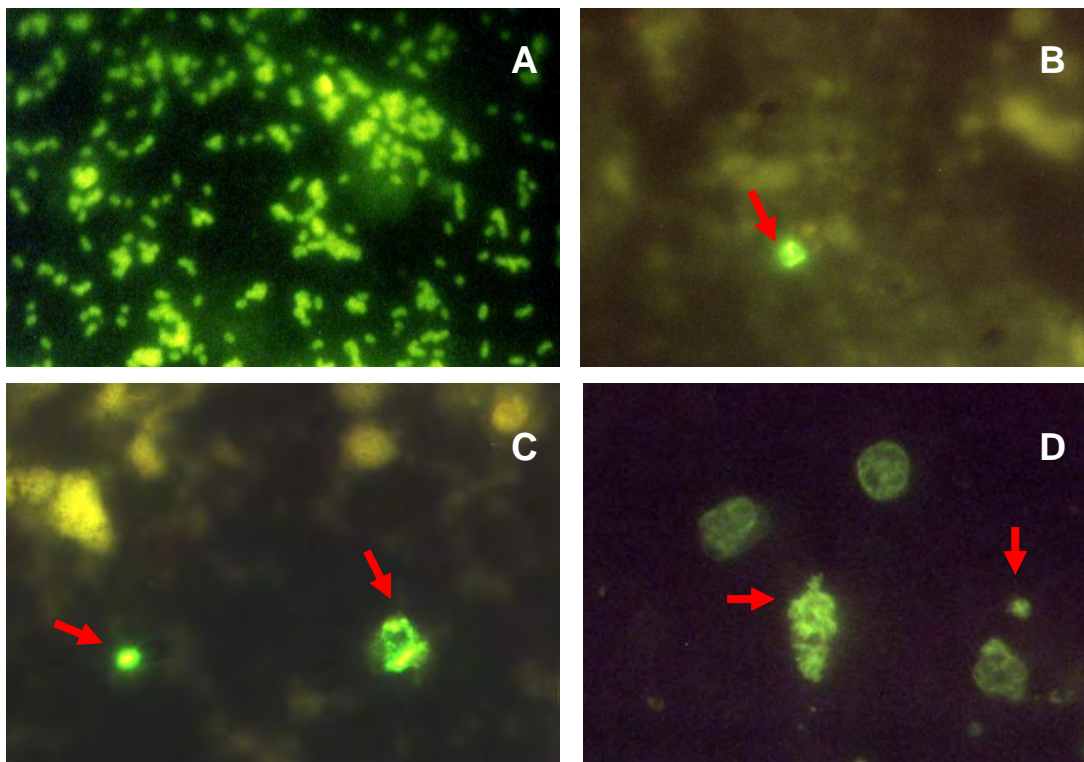


Figura 5. Improntas de riñones de Truchas Arcoiris: (A) Control positivo de la cepa Rs4/86 de *Renibacterium salmoninarum*, Diplobacilos fluorescentes a la inmunofluorescencia indirecta. IFI. 1000x. (B, C, D) Muestras renales Positivos a *Renibacterium salmoninarum* por inmunofluorescencia indirecta: Flechas Rojas. IFI. 1000x

Cuadro 6. Frecuencia renal de Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum*, determinadas por inmunofluorescencia indirecta

Inmunofluorescencia indirecta	Total	%
NEGATIVOS	28/33	84.8
POSITIVOS	5/33	15.2

Las características físicas de los peces positivos se detallan en el apéndice (Cuadro A3). Las alteraciones macroscópicas internas de las cinco muestras renales positivas a *R. salmoninarum* por IFI representan el 60% (3/5), observándose a nivel de solo el cuerpo renal como en ambas porciones la apariencia pulposa además de granulomas (Cuadro 7). Otros órganos como el hígado presentaron una frecuencia del 80% (4/5) observándose palidez y presencia de granulomas. Por último el bazo presentó un 100% (5/5) de lesiones en forma asociada de esplenomegalia y congestión (Cuadro 7).

Cuadro 7. Frecuencia de las alteraciones macroscópicas observadas en riñones, hígados y bazos de Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum* por Inmunofluorescencia Indirecta

Órgano	Alteración	Total	%
Riñón	Cuerpo renal pulposo	2/5	40
	Ambas porciones renales pulposas + granulomas	1/5	20
	Total	3/5	60
Hígado	Palidez hepática	3/5	60
	Palidez hepática + Granulomas	1/5	20
	Total	4/5	80
Bazo	Esplenomegalia + Congestión	4/5	80
	Esplenomegalia	1/5	20
	Total	5/5	100

4.3 Estudio histopatológico

La microscopia determinó las características de los granulomas en tejidos de peces positivos a *Renibacterium salmoninarum* por IFI.

4.3.1 Cabeza renal

De las cinco muestras renales positivas a *Renibacterium salmoninarum* por IFI se determinó, mediante histopatología, lesiones de grado leve. Trastornos inflamatorios relacionados a leve presencia de tejido granulomatoso (Fig. 6A) y escaso aumento de centros melanomacrófagos (CMM) (Fig. 6B), 20% (1/5) respectivamente. Trastorno circulatorio como escasa congestión 40% (2/5) (Fig. 6C) (Cuadro 8).

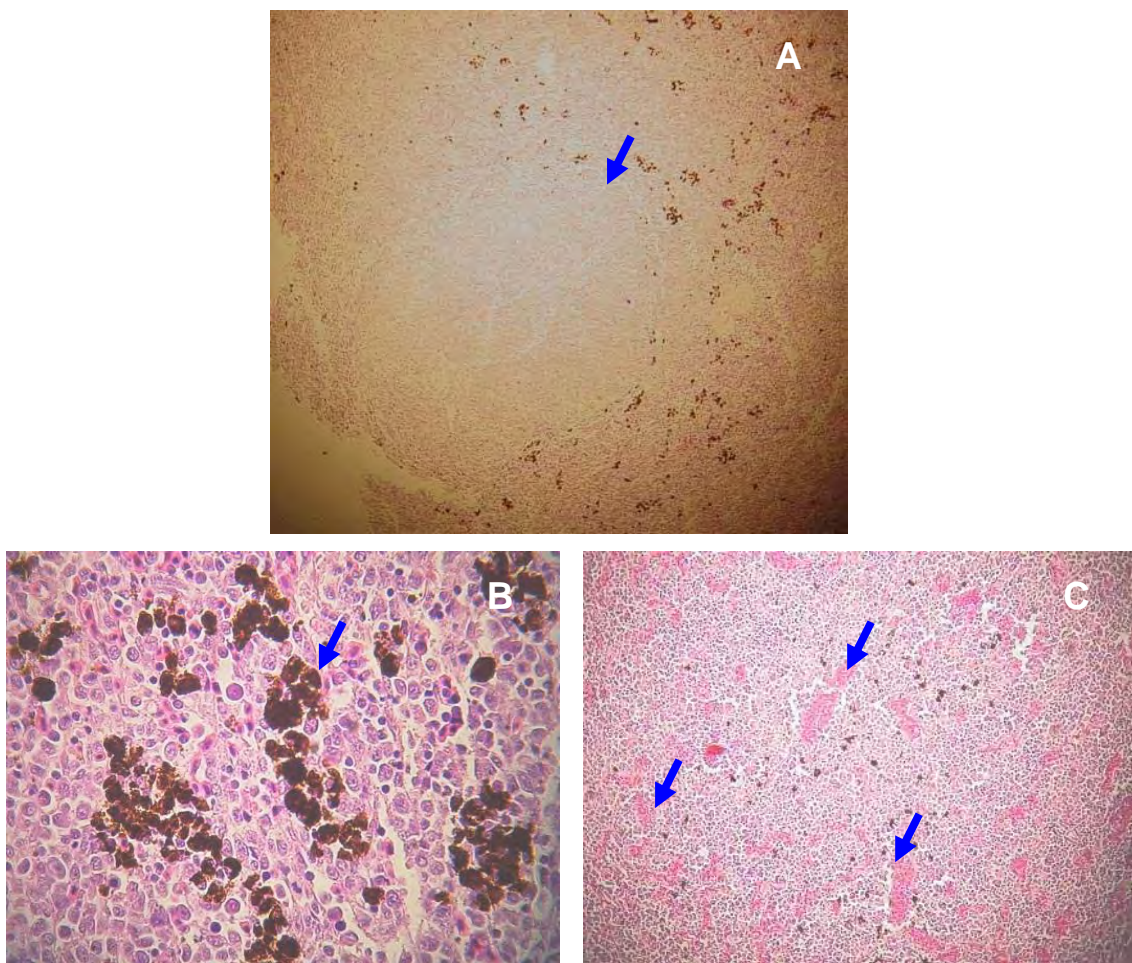


Figura 6. Riñón de Trucha Arcoiris: (A) Granuloma en tejido de cabeza renal: Flecha. Hematoxilina y Eosina: H&E. 50x. (B) Aumento de centros melanomacrófagos en tejido de cabeza renal: Flecha. H&E. 400x. (C) Congestión en tejido de cabeza renal: Flecha. H&E. 100x

Cuadro 8. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de las porciones anteriores de riñones en Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum* determinadas por Inmunofluorescencia indirecta

Tipo de trastorno	Lesiones	Grado				Alteraciones	
		I	II	III	IV	Total	%
Inflamatorios	Aumento CMM	1	0	0	0	1/5	20
	Granulomas	0	1	0	0	1/5	20
Circulatorio	Congestión	2	0	0	0	2/5	40

CMM: Centros melanomacrófagos

De las 28 muestras de cabezas renales negativas a *Renibacterium salmoninarum* por IFI, se determinó por histopatología lesiones en grado escaso a moderado, siendo los trastornos inflamatorios los más notorios, relacionados al aumento de CMM, tejido granulomatoso, células multinucleadas, células epitelioides, asociadas a estructuras compatibles con esporas de hongo sistémico *Ichthyophonus sp.* (Fig. 7). El Trastorno circulatorio fue congestión (Cuadro A4).

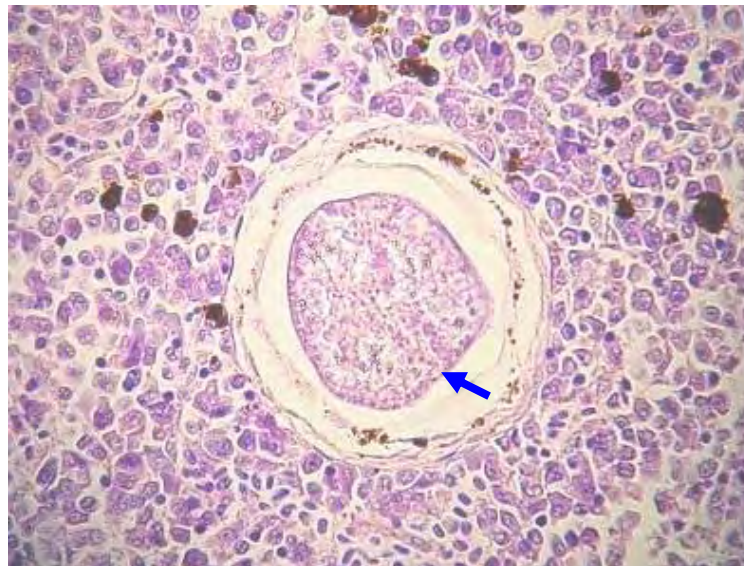


Figura 7. Riñón de Trucha Arcoiris: Tejido de cabeza renal con espora de hongo sistémico (Flecha Azul). H&E. 400x

4.3.2 Cuerpo renal

De las cinco muestras renales positivas a *Renibacterium salmoninarum* por IFI se determinó, mediante histopatología, escasas a moderadas lesiones de esta porción. Trastornos degenerativos con leve degeneración de gotas hialinas en células de túbulos renales (Fig. 8A) y escasa degeneración vacuolar de túbulos renales (Fig. 8B) en una frecuencia de 40% (2/5). Las gotas hialinas se observaron de color intensamente acidófilo, como estructuras a manera de gotas de diferentes tamaños en el citoplasma de las células (Fig. 8C). Algunas veces las células presentaron cambios en el núcleo sin observarse detalle celular evidenciándose leve necrosis coagulativa tubular (Fig. 8D) en 40% (2/5). Así mismo, se observaron escasos a moderados trastornos inflamatorios como moderado aumento de CMM (Fig. 9A), leve presencia de tejido granulomatoso (Fig. 9B, C) y leve presencia de granuloma asociado a espora de hongo *Ichthyophonus sp.* 40% (2/5), además escasa presencia de Células epitelioides 20% (1/5). La espora del *Ichthyophonus sp.* sistémico se observó con la coloración de H-E, como múltiples estructuras ligeramente acidófilas, esféricas y con una fina membrana que la separaba de la reacción granulomatosa. Leve congestión 40% (2/5), observado cuando los capilares y vasos sanguíneos del tejido se presentaban pletóricos y llenos de glóbulos rojos (Fig. 9D). Trastorno de crecimiento y regeneración como leve regeneración tubular 60% (3/5) (Fig. 9E), observándose de una coloración basófila (Cuadro 9).

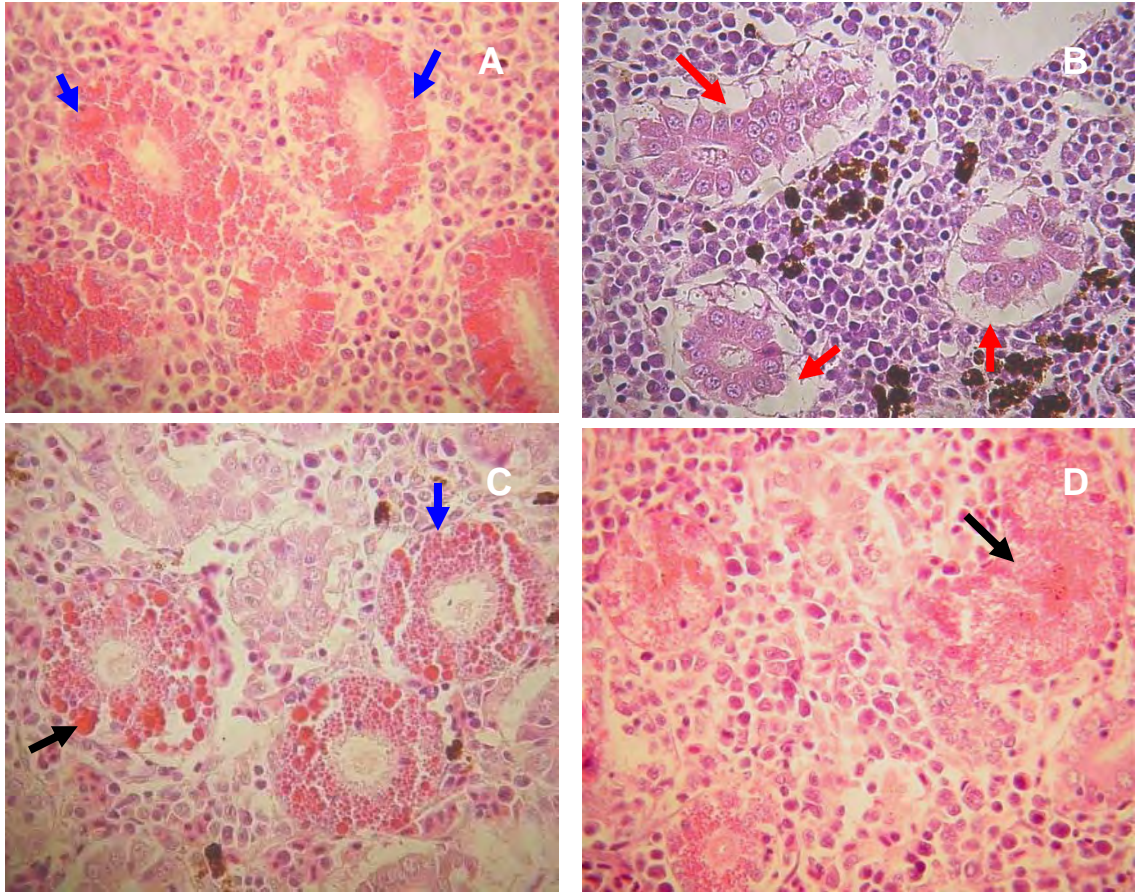


Figura 8. Riñón de Trucha Arcoiris: Tejido de cuerpo renal; (A) Degeneración de gota hialina de túbulos renales (Flechas Azules). H&E. 400x. (B) Degeneración vacuolar de túbulos renales (Flechas rojas). H&E. 400x.: (C) Degeneración de gota hialina; Microvacuolas (Flecha Azul) y macrovacuolas (Flecha negra) en túbulos renales. H&E. 400x. (D) Necrosis coagulativa de túbulo renal, con ausencia de luz tubular (Flecha negra). H&E. 400x

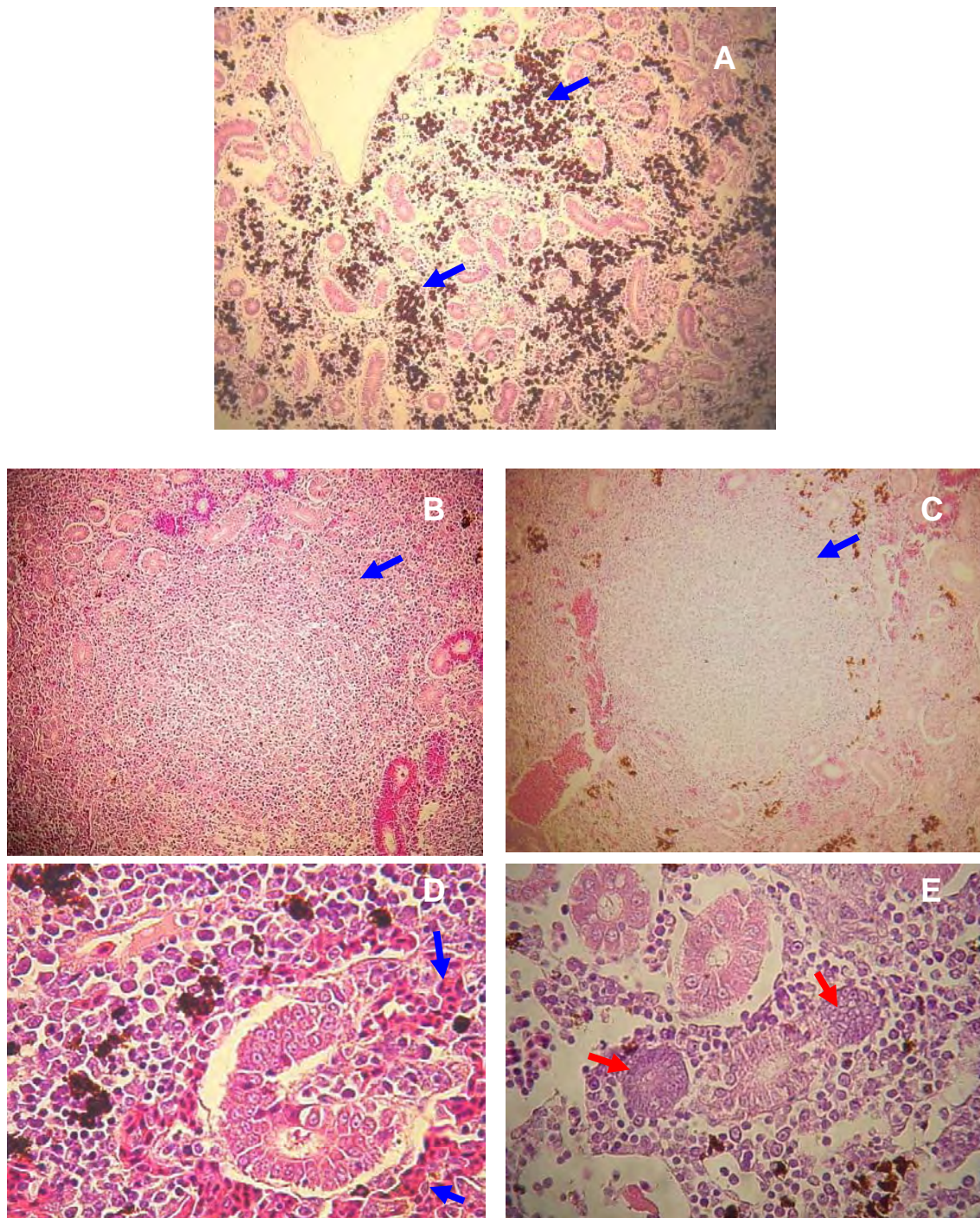


Figura 9. Riñones de Truchas Arcoiris: Tejido de cuerpo renal; (A) Aumento de centros melanomacrófagos entre los túbulos (Flechas azules). H&E. 100x. (B, C) Granulomas entre los túbulos renales (Flechas azules). H&E. 100x. (D) Congestión (FlechasAzules). H&E. 400x. (E) Regeneración tubular, grupo de células basófilas (Flechas rojas). H&E. 100x

Cuadro 9. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de cuerpos renales en Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum* determinadas por Inmunofluorescencia Indirecta

Tipo de trastorno	Lesiones	Grado				Alteraciones	
		I	II	III	IV	Total	%
Degenerativos	Degeneración de gotas hialinas en túbulos renales	1	1	0	0	2/5	40
	Degeneración vacuolar en túbulos renales	2	0	0	0	2/5	40
Necrótico	Necrosis coagulativa de túbulos renales	0	2	0	0	2/5	40
Inflamatorios	Aumento CMM	0	1	1	0	2/5	40
	Granuloma	1	1	0	0	2/5	40
	Granuloma con espora de hongo	0	2	0	0	2/5	40
	Células epitelioides	1	0	0	0	1/5	20
Circulatorio	Congestión	0	2	0	0	2/5	40
Crecimiento y regeneración	Regeneración tubular	1	2	0	0	3/5	60

CMM: Centros melanomacrófagos

De las 28 muestras de los cuerpos renales negativos a *Renibacterium salmoninarum* por IFI se presentaron escasas a severas lesiones, siendo los trastornos inflamatorios los más notorios, con aumento de CMM, presencia de tejido granulomatoso asociado a esporas de *Ichthyophonus sp.* (Fig. 10), células gigantes y células epitelioides. Leve Adaptación con engrosamiento de membrana basal de glomérulo (Fig. 11) (Cuadro A5).

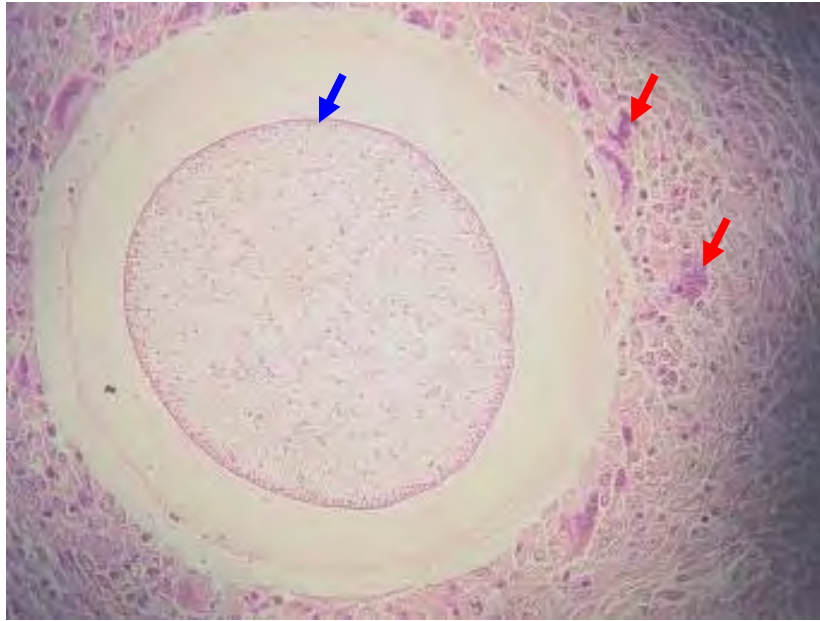


Figura 10. Riñón de Trucha Arcoiris. Cuerpo renal: Granuloma con espora de hongo sistémico (Flecha azul) y células gigantes (Flecha roja). H&E. 400x

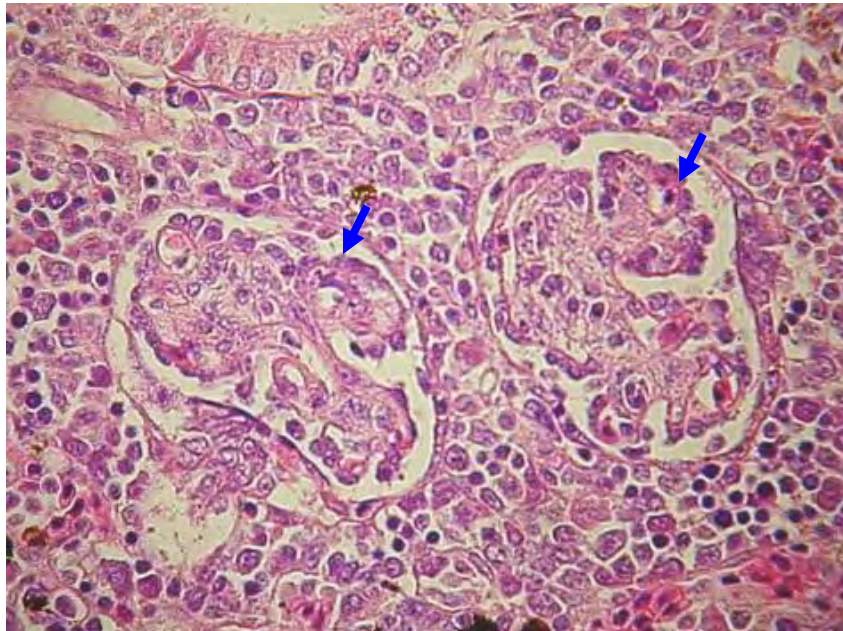


Figura 11. Riñón de Trucha Arcoiris. Cuerpo renal: Engrosamiento de la membrana basal de glomérulos (Flechas azules). H&E. 400x

Por otro lado las muestras de hígados procedentes de las truchas positivas a BKD por IFI presentaron lesiones de forma escasas a severas como degeneración grasa 60% (3/5), trastornos inflamatorios leves con presencia de tejido granulomatoso (Fig. 12A), células multinucleadas asociadas o no a la espora de hongo *Ichthyophonus sp.* sistémico (Fig. 12B) y trastorno circulatorio como moderada congestión (Fig. 13A), 20% (1/5) respectivamente (Cuadro A10). Los Bazos presentaron lesiones de forma escasas a severas, mayormente problemas circulatorios como congestión (Fig. 13B) 80% (4/5) (Cuadro A12). Las branquias presentaron lesiones de forma escasas a severas, siendo las mayores lesiones por trastornos del crecimiento y adaptación como hiperplasia interlamelar y fusión de lamelas secundarias 100% (5/5) respectivamente y atrofia de lamelas secundarias 80% (4/5) (Cuadro A7).

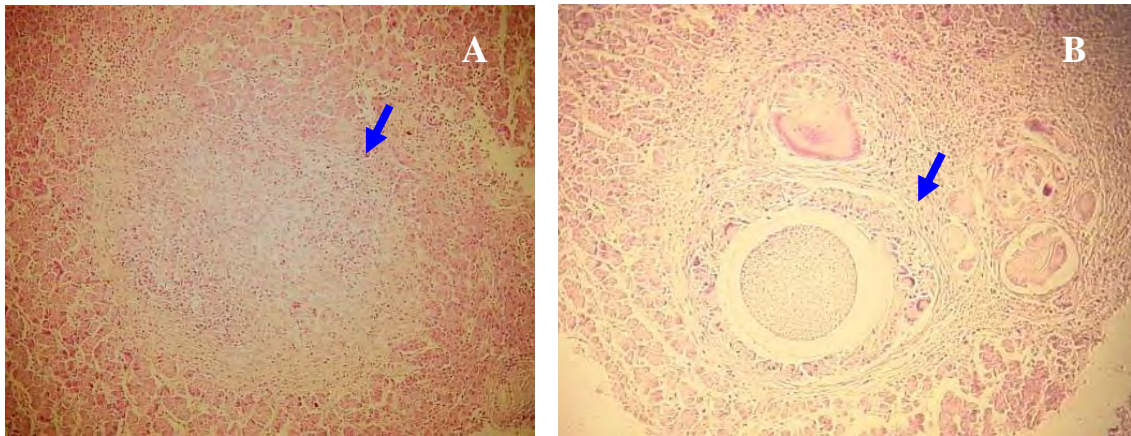


Figura 12. Hígados de Truchas Arcoiris. (A) Granuloma hepático. H&E. 100x. (B) Espora hongo sistémico en granuloma hepático. H&E. 400x

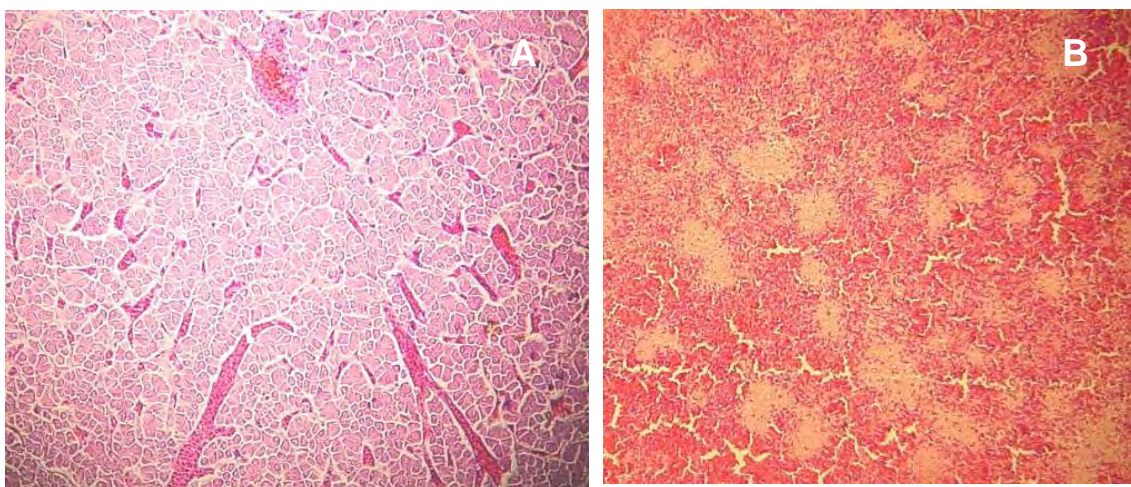


Figura 13. (A) Hígado de Trucha Arcoiris; Congestión hepática. H&E. 100x. (B) Bazo de Trucha Arcoiris; Bazo congestionado. H&E. 50x

De las muestras de los 28 hígados procedentes de truchas negativas a BKD por IFI presentaron lesiones de forma escasas a severas, siendo los trastornos inflamatorios los más notorios, como presencia de tejido granulomatoso, células epitelioides y espora de hongo sistémico, además de trastornos degenerativos como degeneración grasa, necróticas como necrosis coagulativa y circulatorios como congestión (Cuadro A9).

Los Bazos, presentaron escasas a severas lesiones, siendo lo más notorio el trastorno circulatorio como congestión (Cuadro A11).

Branquias, lesiones de forma escasas a severas, siendo las más notorias, trastornos del crecimiento y adaptación como hiperplasia interlamelar y atrofia de lamelas secundarias. Escasos a leves aumento de células granulares eosinofílicas en filamento branquial (Fig. 14A, B) y telangiectasia de lamelas secundarias (Fig. 15) (Cuadro A6).

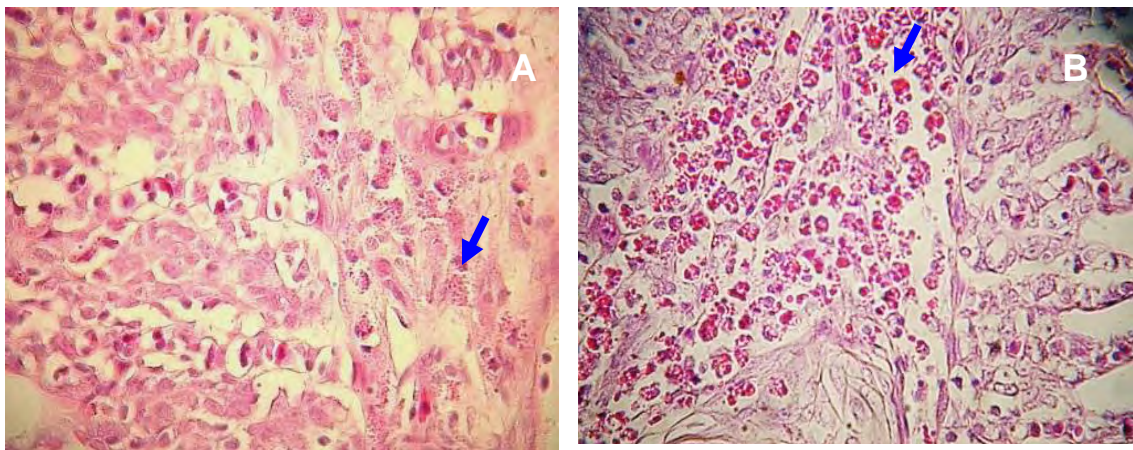


Figura 14. Branquias de Truchas Arcoiris; (A, B) Células granulares Eosinofílicas en filamentos branquiales. H&E. 400x



Figura 15. Branquias de Trucha Arcoiris: Telangiectasia en lamela secundaria. H&E. 100x

V. DISCUSIÓN

Hasta la fecha en nuestro país no se han llevado a cabo estudios sobre determinación de la presencia de *Renibacterium salmoninarum* en la Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo, por lo cual este trabajo representa el primer reporte de infección de BKD en el país, enfermedad que produce grandes pérdidas en los centros de explotación piscícola del mundo.

La utilización de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de *Renibacterium salmoninarum* en tejidos renales obtuvo como frecuencia 15.2% (5/33) en Truchas Arcoiris de cultivo clínicamente enfermas. IFI es una prueba recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como método de diagnóstico para BKD que detecta bacterias en una muestra de tejido (OIE, 2006). Así mismo, esta prueba a permitido la detección de la bacteria en otras muestras como liquido ovárico de salmónidos (Lee y Gordon 1987), pudiendo ser detectada en infecciones subclínicas (Bullock y Stuckey 1975b, Sakai *et al.*, 1992). Esta prueba tiene una alta sensibilidad respecto a pruebas convencionales como Tinción Gram (Bullock y Stuckey, 1975b; Paterson *et al.*, 1979), así mismo también depende de la calidad de anticuerpos empleados (Jansson, 2002).

Los resultados del presente estudio difieren de los determinados por diferentes investigadores que también usaron la prueba de IFI. Paterson *et al.* (1979) en salmón del atlántico juveniles (*Salmo salar*) donde se obtuvo 33,4% (152/456) y 35,1% (13/37) en salmones del atlántico adultos, así mismo Griffiths *et al.* (1996) determinó en tejido renal de hembras adultas de salmón del atlántico 12% (24/200) y 7,5% (15/200) en

fluido ovárico. Stevenson (1999) en tejido renal de hembras adultas de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) determinó 12,5% (10/80). Estos estudios fueron realizados en Canadá donde emplearon un mayor número muestral, salmónidos de diferentes especies, de diferentes estados fisiológicos y diferentes edades.

La forma por la cual BKD se ha introducido en un país, es posible a las importaciones de ovas embrionadas contaminadas con el agente intracelular *Renibacterium salmoninarum* (Gutenberger *et al.*, 1997) debido a que este patógeno se transmite verticalmente infectando a la progenie (Fryer y Sanders, 1981; Evelyn *et al.*, 1986b), teniendo en cuenta que la primera importación al país se realizó en 1928 (Godoy, 2002) proveniente de los EEUU en donde fue reportada por Belding y Merrill en 1935 y actualmente se importa de Canadá y Noruega. Por otro lado, la probabilidad de transmisión de la enfermedad a peces susceptibles de nuestro país se encontraría agravado por el deficiente control de importación de ovas embrionadas provenientes de hembras infectadas (Evelyn 1993; Smith *et al.*, 2001). Lamentablemente los piscicultores no acuden a los centros de investigación y la enfermedad puede estar subdiagnosticada clínicamente. Además no hay normas sanitarias en nuestro país que exijan el diagnóstico de esta y otras enfermedades. Aunque en la actualidad la piscifactoría de estudio no importa ovas, los resultados podrían ser secuela de anteriores importaciones o instalaciones.

Sin embargo, el agente puede estar diseminado en otras piscifactorías las cuales importan ovas embrionadas y a su vez éstas pueden afectar a las que están cercanas (Evelyn, 1993; Smith *et al.*, 2001; PROYECTO FIP, 2003), así mismo la utilización del mismo curso o fuente de agua, alimento con vísceras contaminadas mal pasteurizadas pueden contribuir a la diseminación del agente (Roberts, 1981; De Kinkelin *et al.*, 1991). Mitchum & Sherman (1981), Hastein & Lindstad (1991) refieren que las medidas para controlar las pérdidas causadas por BKD pueden anularse por la exposición constante de las piscifactorías a la bacteria, transmitida por el agua mediante descargas originadas por peces silvestres de alto riesgo que residen aguas arriba de los criaderos, como la presencia de Truchas Arcoiris silvestres según refieren Smith *et al.* (2001) y Jansson (2002). Por otro lado Jonsdottir *et al.*, (1998), Bruneau *et al.* (1999) mencionan que *R. salmoninarum* es a menudo endémico en salmónidos silvestres.

Por el contrario en el presente trabajo las muestras provinieron solo de la especie *Oncorhynchus mykiss*, de etapa precomercial o engorde provenientes de reproductores nacionales y que fueron recolectados en Febrero, coincidiendo con la época de lluvia de la región entre Noviembre a Marzo. Estos factores podrían influenciar en la frecuencia de BKD. Las condiciones ambientales del tiempo de muestreo coincidieron con la época de lluvias el cual brindo un caudal adecuado para las pozas y una temperatura promedio del agua 10.8°C, así mismo las condiciones químicas de oxígeno disuelto (7.5 mg/l), pH (7.3) estuvieron dentro de los rangos aceptables, no generando un estrés suficiente como para producir un brote de enfermedad. Así mismo, Eissa (2005) reporta que depende de la virulencia del tipo de cepa de BKD y la especie de salmónido. Starliper *et al.* (1997) menciona que la Trucha Arcoiris es relativamente resistente al desafío con la cepa ATCC 33209 de BKD. Se ha reportado que la Trucha de arrollo (*Salvelinus fontinalis*) es la especie mas susceptible a la infección por *R. salmoninarum* entre todos los salmónidos (Eissa, 2005; Eissa *et al.*, 2006). Además, el desencadenante de la manifestación de las infecciones subclínicas de BKD son aparentemente las formas de estrés como las variaciones bruscas de temperatura, disminución del oxígeno disuelto en el agua, excesivo manipuleo en el manejo (Roberts, 1981; De Kinkelin *et al.*, 1991; Noga, 2000) y concomitancia con otros agentes patógenos conducen a la presencia masiva de BKD (Larenas, 1995). Si bien hemos demostrado la presencia de esta enfermedad, aún no podemos definir que la baja frecuencia es de un tipo de cepa de BKD de baja virulencia, por no haber sido determinada.

Por otro lado, la baja frecuencia 15.2% (5/33), obtenida en este estudio podría deberse a que IFI es un método de diagnóstico de una sensibilidad no tan alta como las pruebas moleculares, sin embargo, mediante esta prueba se pudo determinar la presencia de *Renibacterium salmoninarum* en una piscigranja de la región Junín en nuestro país. Habiéndose demostrado el patógeno, se puede deducir que por estos resultados positivos a BKD, *Renibacterium salmoninarum* representa un potencial factor de riesgo de enfermedad en la Truchas Arcoiris de cultivo intensivo y por ende para la producción, que puede ocasionar morbilidad y mortalidad, así como pérdidas económicas como las reportadas en el país vecino de Chile en la década del 80 siendo una de las más importantes (Campalans, 1990) causando mortalidades de 50% en las piscifactorías de salmón coho (Lindbergh, 1993), e incluso superiores en otras especies

de salmónidos del pacífico (Shimazu y puchi, 1984), por lo que su estudio significa de suma importancia para que los centros piscícolas cuenten con sistemas de monitoreo preventivo, sobre todo el reproductivo, así evitar un incremento de la infección por BKD. El *Renibacterium salmoninarum* por ser de transmisión vertical y horizontal, en el país podría diseminarse si es que no se hace monitoreo de la presencia del agente previamente al transporte o traslado de ovas embrionadas, semillas o reproductores, principalmente con el transporte a largas distancias, así como también el transporte en distancias cortas de alevinos para engorde como repoblamiento. En el país ocasionaría una reducción y pérdida de la producción debido al alto porcentaje de mortalidad, decrecimiento de la conversión alimenticia, el incremento del costo de mano de obra, la predisposición a otros patógenos y pérdidas por la diferencia de calidad del producto. Además, al ser una bacteria de carácter intracelular, no responde a los tratamientos con antibióticos de manera eficiente, debido a esto es difícil su eliminación y erradicación en un país. De acuerdo a la OIE, la presencia de esta enfermedad en un país, se le debe aplicar los requisitos de notificación de enfermedades no inscritas. Esta condición pondría en riesgo las exportaciones en Truchas Arcoiris de nuestro país. Además es necesario realizar una prueba molecular para confirmar los resultados obtenidos mediante esta prueba de IFI, como lo manda la OIE.

Según Smith *et al.* (2001) y Jansson (2002), la principal lesión histopatológica corresponde a una respuesta granulomatosa crónica que afecta predominantemente el tejido hematopoyético renal, lesión que fue observada en múltiples casos provenientes de este estudio, así como otras truchas de otras piscigranjas, sugiriendo la presencia de la enfermedad en nuestro medio.

Histológicamente en la cabeza renal de las 5 muestras renales positivas a *Renibacterium salmoninarum* por IFI, se pudo encontrar trastornos inflamatorios tales como una leve presencia de tejido granulomatoso y escaso aumento de centros melanomacrófagos (CMM) en una frecuencia de 20% (1/5) respectivamente. Estas lesiones se deben al rol que cumple el riñón por su profunda capacidad de filtrado y la afinidad del agente patógeno como indican Noga (2000) y Ferguson (2006). En cuanto a los granulomas se forman por activación de macrófagos (Secombes, 1985; Jansson 2002). Así mismo Ferguson (2006) considera que según la respuesta del hospedero el

granuloma se forma de manera discreta. Con respecto a los CMM, su presencia es normal entre las células hematopoyéticas de la cabeza renal (Cepeda y Oróstegui, 2000), pero se pueden ver aumentados en número si se presenta ante un agente como BKD que genera una inflamación crónica (Bruno, 1986). Flaño *et al.* (1996) y Agius y Roberts (2003) reportan que este incremento de CMM puede actuar como depósitos focales de bacterias intracelulares desde donde pueden desarrollarse infecciones crónicas. Además, Wood & Yasutake (1956) y Jansson (2002), indican que el tejido hematopoyético del riñón anterior es afectado en primer lugar, seguido de grandes daños principalmente del tejido excretor en el cuerpo renal. La escasa congestión 40% (2/5), probablemente fue debido al rol que cumple el riñón como órgano de profunda vascularización y doble suministro de sangre desde el sistema arterial y venas portorreñales que pueden aumentar la posibilidad de enfermedades concurrentes y producir congestión (Roberts y Shepherd, 1980; Vega, 2004; Ferguson, 2006).

Histológicamente en el cuerpo renal de las 5 muestras renales positivas a *Renibacterium salmoninarum* por IFI, se pudo encontrar trastornos inflamatorios, como una leve presencia tejido granulomatoso 40% (2/5) y reacción granulomatosa con escasa presencia de células epitelioides 20% (1/5) lo cual se ha descrito que es representativo de BKD. En cuanto al tejido granulomatoso, Peters (2000) reportó una frecuencia de 2% (3/151) en Truchas Arcoiris, que presentaban afecciones renales principalmente en relación con cuadros de BKD según informes histopatológicos provenientes de centros de cultivos localizados entre la X^{ma} y XII^{va} regiones de Chile, además asume que es observado en los tejidos cuando el agente etiológico es de virulencia moderada y el hospedero presenta una buena respuesta inmunológica. El tejido granulomatoso renal de salmónidos puede estar rodeado por células epitelioides (Smith *et al.*, 2001; Jansson, 2002), los cuales se forman por la adhesión de macrófagos activados (Secombes, 1985). Se sostiene que las lesiones granulomatosas en el intersticio debido a bacterias, probablemente, en parte es al amplio suministro de sangre y la capacidad de captura del órgano, y por otro lado, el proceso de reacción intersticial secundaria ocurre con la participación de los nefrones debido a la extensión de la lesión a través del intersticio (Ferguson, 2006). Flaño *et al.*, (1996) en infecciones experimentales de alevinos de salmón coho, demuestra células epitelioides en tejido renal a la segunda semana post

infección mediante microscopía electrónica. En el presente trabajo las células epitelioides se observaron escasas y no rodeaban las reacciones granulomatosas.

En cuanto a los CMM, se observó un moderado aumento 40% (2/5). Según Vega (2004) los CMM normalmente están presentes entre los túbulos renales, como se observaron en el presente estudio. Peters (2000) reportó una frecuencia de 31.8% (48/151) de CMM en Truchas Arcoiris. Por otro lado este autor menciona que los CMM aumentan en número con la edad e independientemente del tipo de agente etiológico responsable del proceso inflamatorio en el órgano afectado. Según Agius y Roberts (2003) lo asocian a la calidad de agua, mientras que Ferguson (2006) menciona que además de aumentar de tamaño, se vuelven más oscuros y numerosos por causas de inanición y estrés. Así mismo, mencionan que el aumento de CMM bordea la lesión de la inflamación crónica (Bruno, 1986; Ferguson, 2006). En el presente trabajo, el aumento de CMM en el intersticio de los túbulos renales fue en forma difusa sin rodear a las reacciones granulomatosas.

Por otro lado se encontró una leve presencia de espora de hongo compatible con *Ichthyophonus sp.* conformando un granuloma con una frecuencia de 40% (2/5). Se menciona que dichas esporas forman verdaderos granulomas bordeados por células epitelioides (Noga, 2000). Anteriores trabajos en el país han reportado ictiofonosis con una prevalencia de 100% (20/20) en Truchas Arcoiris de 10 meses, de la misma piscigranja en estudio (Mateo, 1996), lo cual sugiere que existen otras causas que inducen a la presencia de granulomas en el tejido renal de la Trucha Arcoiris diferentes a la de BKD.

Dentro de los trastornos degenerativos observados se evidenció una leve degeneración de gotas hialinas en túbulos renales en 40% (2/5). A diferencia de lo reportado por Peters (2000), quien obtuvo una frecuencia de 17.2% (26/151) y Iregui *et al.* (2004) 38% (57/149) en degeneración de gotas hialinas en el epitelio tubular de Truchas Arcoiris que presentaban lesiones renales. Se ha determinado que estas gotas hialinas son causadas por elevados niveles de proteína (44%-50%) en la dieta de alevinos de tilapia (*Oreochromis nilotica*) como lo reportó Jiménez *et al.* (2008). Por otro lado, se considera como un cambio, indicativo de un metabolismo celular anormal

(Kumar *et al.*, 2003). Además lo asocian con daño glomerular causado principalmente por sustancias químicas, niveles elevados de amoníaco, problemas bacterianos que ocasionan lesión vascular del glomérulo (Roberts, 1981; Ferguson, 2006), razón por la cual la proteína escapa a través del filtro glomerular pasando al túbulo proximal donde es reabsorbido por las células epiteliales tubulares (Ferguson, 2006). Así mismo Hibiya (1982) y Ferguson (2006) señalan que puede aparecer en células tubulares renales de peces aparentemente sanos, además Hibiya (1982) este caso lo identifica cuando no hay cambios evidentes en el núcleo celular. Así mismo a pesar que autores mencionan el hallazgo en peces sanos, en este estudio las gotas hialinas las encontramos en peces clínicamente enfermos. Otro de los cambios observados fue la degeneración vacuolar de túbulos renales en una escasa frecuencia de 40% (2/5), lo cual difiere por lo encontrado por Peters (2000) quien reportó una frecuencia de 31.1% (47/151) constituyendo el principal problema degenerativo asociado a trastornos de origen proteico. Esta diferencia puede ser explicada al menor número de muestras empleadas en comparación con el de Peters.

En los trastornos necróticos se determinó leve Necrosis coagulativa de túbulos renales con 40% (2/5). Esta lesión está relacionada con la pérdida de capacidad osmoreguladora celular como resultado de la hinchazón mitocondrial (Ferguson, 2006) y el exceso de acumulación de gránulos proteináceos puede llevar a necrosis (Hibiya, 1982). Peters (2000) reportó una frecuencia de 7.4% (47/633) de trastornos necróticos en túbulos renales en salmónidos y menciona que son consecuencia de procesos patológicos sistémicos que tienen lugar en el tejido hematopoyético. Por otro lado, Bruno (1986) asocia esta necrosis coagulativa directamente a BKD. Al respecto Ferguson (2006), Roberts (1981) mencionan que este tipo de trastornos además de ser consecuencia de la acción de agentes bacterianos, también se presentan como consecuencia a alteraciones circulatorias como congestión crónica, isquemia, infarto y trombosis, también a la exposición prolongada de fármacos y en el estrés.

Como único trastorno circulatorio se determinó leve congestión con una frecuencia de 40% (2/5). Peters (2000) reportó una frecuencia baja 5.3% (8/151) siendo esta lesión la de mayor presentación como trastorno circulatorio renal en Truchas Arcoiris. Sin embargo la congestión se presenta también por fallas respiratorias

(branquiales) como sucede en BKD y por fallas cardiacas (pericarditis) (Ferguson, 2006).

En cuanto a la regeneración tubular predominantemente fue leve 60% (3/5), observándose el túbulo de una coloración basófila. Al respecto Reimschuessel (2001) menciona que los peces tienen la capacidad de regeneración de las células tubulares renales dañadas como en los mamíferos. Ferguson (2006) afirma que se pueden encontrar normalmente en peces en crecimiento, sin embargo, se puede encontrar en peces adultos lo que indica un episodio anterior de lesión tubular. En este estudio se evidenció que la regeneración tubular es consecuencia de lesión de túbulo renal.

Además lo más representativo de los hígados de las 5 Truchas Arcoiris positivas a BKD fue la presencia de escasa a severa degeneración grasa con una frecuencia de 60% (3/5), a diferencia de Rosenthal (2007) quien reportó 70.6% (41/58) en Truchas Arcoiris juveniles, y López *et al.*, (2001) 45.6% (323/709) en salmónidos. Esta lesión puede deberse a la amplia variedad de antígenos y metabolitos que circulan por la sangre y requieren su paso por este órgano antes de ser eliminados, además los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en las dietas pueden sufrir cambios oxidativos como rancidez producida por estar almacenado a altas temperaturas, en el ambiente o falta de un adecuado antioxidante como vitamina E (Ferguson, 2006). En este estudio, se explicaría por un inadecuado transporte del alimento, sin las condiciones de temperatura y humedad, produciéndose cambios oxidativos de los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en la ración que recibían las truchas precomerciales.

Bazos con una moderada a severa congestión en 80% (4/5). Esta lesión es reportada por Brown (2000) y Noga (2000) sustentando que esta presente en diversos procesos infecciosos como furunculosis, BKD, Yersiniosis, Piscirickettsiosis entre otros. Sin embargo todas estas enfermedades cursan con otros signos además de la esplenomegalia y se necesita de pruebas específicas para realizar el diagnóstico del agente que lo causa. Por último, en ambos órganos hígado y bazo, se observaron leve presencia de tejido granulomatoso 20% (1/5).

Además, las branquias presentaron escasas a severas lesiones, de hiperplasia interlamelar y fusión de lamelas secundarias, ambas con una frecuencia de 100% (5/5), y atrofia de lamelas secundarias 80% (4/5). Noga (2000) afirma que la hiperplasia epitelial como respuesta al daño branquial puede originar la fusión de las láminas y filamentos. Sin embargo la presentación de estas lesiones tiene alto grado de inespecificidad, debido a que es respuesta ante condiciones adversas del medio acuático como bacterias, parásitos o mala calidad del agua asociado a un excesivo acumulo de materia orgánica y su descomposición tal como amoníaco y nitritos (Noga 2000; Ferguson, 2006). En el presente estudio los cambios de las branquias en los peces se habrían producido a causas diferentes de parasitosis y bacterias.

Histológicamente las muestras negativas a *Renibacterium salmoninarum* por IFI de la cabeza y cuerpo renal presentaron una mayor frecuencia de forma leve en trastornos inflamatorios, representado por tejido granulomatoso, células epitelioides, células gigantes y granulomas consecuencia del hongo sistémico *Ichthyophonus sp.*, mientras que los CMM fueron observados moderadamente. Los hígados mostraron tejido granulomatoso, células epitelioides, espora de hongo sistémico y degeneración grasa. Los bazos con congestión presentaron mayor frecuencia. Las branquias presentaron hiperplasia interlamelar y atrofia de lamelas secundarias. Estos órganos guardan relación principalmente con agentes infecciosos de tipo bacteriano. Peters (2000) encontró en Truchas Arcoiris una frecuencia de trastornos granulomatosos renales 2% (3/151) y Lopez *et al* (2001) trastornos inflamatorios hepáticos 21.1% (38/180) en Truchas Arcoiris. Peters (2000) menciona que la presencia de granulomas renales se observó principalmente en relación con cuadros de BKD y secundariamente con afecciones por *Nocardia sp.* y micosis (*Exophiala sp*) en salmónidos. Entre las posibles agentes bacterianos responsables de causar granulomas en parénquima hepático de peces tenemos *Flavobacterium sp* y *Aeromona sp* (De Kinkelin *et al.*, 1991; Noga, 2000). Estos resultados sugieren la existencia de agentes infecciosos diferentes a la Renibacteriosis causantes de granulomas en peces y que son necesarios estudiarlos.

A pesar de la baja frecuencia a *Renibacterium salmoninarum* determinada por IFI a la necropsia, los cinco especímenes positivos a BKD evidenciaron presencia de lesiones macroscópicas internas que estuvieron relacionadas a riñón pulposo

parcialmente en forma individual en el cuerpo renal y totalmente en forma mixta acompañado de granulomas en ambas porciones del riñón, sin embargo esta última lesión solo fue vista en una de las truchas. Estas lesiones granulomatosas focales o multifocales se han descrito en salmón del atlántico silvestre (*Salmo salar*) desde los años 30 (Makie *et al.*, 1933), y a veces en el bazo e hígado. Además, puede haber líquido turbio en la cavidad abdominal, hemorragias en la pared del abdomen y en las vísceras y una capa membranosa difusa y blanca (pseudomembrana) en uno o más de los órganos internos (Young y Chapan, 1978; Bruno, 1986; Gutenberger *et al.*, 1997). El presente estudio difiere de los encontrados en otros trabajos y resaltándose la presencia de *Renibacterium salmoninarum* mediante IFI por primera vez en el país. Por último, el hígado presentó palidez hepática y granulomas, mientras el bazo esplenomegalia y congestión.

La necropsia del resto de peces, negativos a *Renibacterium salmoninarum* por IFI, se evidencian alteraciones renales, hepáticas, esplénicas similares a las descritas anteriormente, sin embargo estas lesiones son similares a otras enfermedades como Tuberculosis, Nocardiosis, Ictiofonosis lo cual hace más difícil el diagnóstico en peces frescos, es así que se hace necesario la utilización de histopatología apoyada de coloraciones especiales como la Tinción de Ziehl Nielsen - ácido alcohol resistentes, formaciones pseudomiceliales (De Kinkelin *et al.*, 1991) y coloración Hematoxilina - Eosina (Mateo, 1996) respectivamente. En el presente estudio se pudo identificar la presencia de *Ichthyophonus sp.* asociándose algunas de las lesiones a este patógeno.

Al examen externo de todas las Truchas Arcoiris, se pudo determinar diferentes tipos de características clínicas y lesiones. Faure (1980), De Kinkelin *et al.*, (1991) consideran que el crecimiento del pez se encuentra influenciado por numerosos factores de índole propio y ambiental. En el presente trabajo se encontró entre los mayores porcentajes de frecuencia, la melanosia parcial de la piel con 87,9% (29/33), que es por la alteración de la distribución de la melanina en la dermis por situaciones de estrés, enfermedad o deficiencias nutricionales, siendo un indicativo de alteración de la condición de la salud. Nado lento y superficial 57,6% (19/33), palidez branquial de 51,5% (17/33) y pez en el fondo 36,4% (12/33), son alteraciones del comportamiento a consecuencia de diversas causas o factores ambientales. Alteración de aletas 21,2%

(7/33) como consecuencia de hongos externos, fricciones y abrasiones del mucus de protección del pez en el manejo. Así, Rand y Cone (1990) no encontraron diferencia significativa entre Truchas Arcoiris sanas y las enfermas. Sin embargo, en el presente estudio, se diferenciaban de las truchas sanas, y a pesar de estar en el rango de talla (15-24 cm) y peso (60-180g) (Cuadro A13), mostraron signos y lesiones de enfermedad. Los peces pueden carecer de manifestación de signos externos, y si lo manifiestan no es patognomónico, siendo necesario relacionarlos con las lesiones internas, histopatológicas y pruebas de diagnóstico de mayor sensibilidad (Roberts, 1981; OIE, 2006).

VI. CONCLUSIONES

- El *Renibacterium salmoninarum*, está presente en una piscigranja de la Región Junín del Perú.
- El cuerpo renal de las muestras positivas a BKD por inmunofluorescencia indirecta, presentaron los mayores procesos inflamatorios caracterizados por granulomas, aumento de centros melanomacrófagos y células epitelioides.
- Macroscópicamente las lesiones en peces positivos a BKD se visualizaron mayormente en el cuerpo renal.
- Otro causante de granulomas en tejido renal de Truchas Arcoiris de crianza comercial es el *Ichthyophonus sp.*

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar controles diagnóstico sanitarios de la importación de ovas embrionadas, verificando que procedan de reproductoras libres de BKD.
- Se recomienda que los centros piscícolas cuenten con sistemas de monitoreo de rutina que incluyan IFI, además la posterior confirmación con PCR para la detección de BKD y mantener un diagnóstico sanitario de reproductores previniéndolos de Renibacteriosis.
- Realizar estudios de otros patógenos que susceptibilizan a las Truchas Arcoiris de cultivo, que originan mayor infección y manifestación clínica de BKD.

VIII. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. **Agius, C. and Roberts, RJ. 2003.** Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases* 26: 499-509.
2. **Amin AB, Mortensen L, Poppe TT. 1992.** Histology Atlas. Normal Structure of Salmonids. Akvapatologisk Laboratorium AS. Bodo, Norway. p 84-93
3. **Amlacher E. 1964.** Manual de enfermedades de los peces. Técnica de la investigación. 1^{ra} edición. España: Editorial Acribia. Zaragoza. p 13-23.
4. **Armstrong RD, Evelyn TPT, Martin SW, Dorward W. Ferguson HW. 1989.** Erythromycin levels within eggs and alevins derived from spawning broodstock chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) injected with the drug. *Diseases of Aquatic Organisms* 6: 33-36.
5. **Austin B. 1985.** Evaluation of antimicrobial compounds for the control of bacterial kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 8: 209-220.
6. **Austin, B, Rayment JN. 1985.** Epizootiology of *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 8:505-509.
7. **Austin B, Embley TM, Goodfellow M. 1983.** Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 17: 111-114.
8. **Balfry SK, Albright LJ, Evelin TPT. 1996.** Horizontal transfer of *Renibacterium salmoninarum* among farmed salmonids via the fecal-oral route. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 63-69.
9. **Barton TA, Bannister LA, Griffiths SG, Lynch WH. 1997.** Further Characterization of *Renibacterium salmoninarum* extracellular products. *Applied and Environmental Microbiology.* 63: 3770–3775

10. **Belding DL, Merrill B. 1935.** A preliminary report upon a hatchery disease of the Salmonidae. Trans. Am. Fish. Soc. 65: 76-84.
11. **Bell GR, Higgs DA, Traxler GS. 1984.** The effect of dietary ascorbate zinc and manganese on the development of experimentally induced bacterial kidney disease in salmonids. Journal of Fish Diseases. 9: 76-64.
12. **Bell GR, Hoffmann RW, Brown LL. 1990.** Pathology of experimental infections of the sablefish, *Anoploma fimbria* (Pallas), with *Renibacterium salmoninarum*, the agent of bacterial kidney disease in salmonids. Journal of fish diseases. 13: 355-367.
13. **Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999.** Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish. Dis. 22: 25-34.
14. **BIOS Chile. 2000.** BKD Fluorotest indirecto. Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta para *Renibacterium salmoninarum*. Ingeniería Genética S.A. 2p.
15. **Bly JE, Clem W. 1992.** Temperature and teleost immune functions. Fish & Shellfish Immunology: 2: 159-171.
16. **Brown, L. 2000.** Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. España: Editorial Acribia. 460p
17. **Bruneau NN, Thorburn MA, Stevenson RMW. 1999.** Occurrence of *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, and infectious pancreatic necrosis virus in Ontario salmonid populations. J. Aquat. Anim. Health. 11: 350–357.
18. **Bruno DW, 1986.** Histopathology of the bacterial kidney disease in laboratory infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Fish Diseases. 9:523-537.
19. **Bruno DW. 1990.** Presence of a saline extractable protein associated with virulent strains of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. Bulletin of the European association of fish pathologists. 10: 8-10.
20. **Bruno DW, Alderman DJ, Schlotfeldt HJ. 1997.** ¿Que debo hacer? Un manual práctico para el maricultor. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 64p.
21. **Bullock G, Stuckey H. 1975a.** *Aeromonas salmonicida*: detection of asymptotically infected trout. Progr. Fish Cult. 37: 237-239.

22. **Bullock G and Stuckey H. 1975b.** Fluorescent antibody identification and detection of the *Corynebacterium* causing kidney disease of salmonids. Journal of Fisheries Research Board Canada. 32: 2224-2227.
23. **Bullock GL, Griffin BR, Stuckey HM. 1980.** Detection of *Corynebacterium salmonis* by direct fluorescent antibody test. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 37: 719-721.
24. **Bullock GL, Stuckey HM & Mulcahy D. 1978.** Corynebacterial kidney disease: egg transmission following iodophore disinfection. Fish Health News 7, 51-52.
25. **Campalans M. 1990.** Estado sanitario de la salmicultura en Chile. Aquanoticias Internacional. 7: 5-7.
26. **(CEFAS) Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science. 2007.** Bacterial Kidney Disease - Detection and Control in Great Britain. CEFAS Finfish News. (4). 10p.
27. **Cepeda R, Oróstegui C. 2000.** Histología de peces. 2^{da} edición. Universidad de Chile. 102p.
28. **Chien MS, Gilbert TL, Huang C, Landolt ML, O'Hara PJ & Winton JR. 1992.** Molecular cloning and sequence analysis of the gene coding for the 57-kDa major soluble antigen of the salmonid fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiology Letters. 96: 259-266.
29. **Chuquín C. 2007.** 70% de exportaciones de truchas peruanas se dirigen a Estados Unidos y Canadá. CATPES, plataforma de servicios y comercio electrónico para la gran industria pesquera y acuicultora [21 Abril 2008]. Disponible en: <http://www.catpes.com/ver2.asp?ID=4247>.
30. **Couch JA, Fournie JW. 1993.** Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms. CRC Press. Boca Raton. USA. 576 p.
31. **Cuellar L. 1984.** Acuicultura e ictiopatología. Actas de la Academia de Ciencias Veterinaria de Madrid. 2: 205-221.
32. **Dale OB, Gutenberger SK & Rohovec JS. 1997.** Estimation of variation of virulence of *Renibacterium salmoninarum* by survival analysis of experimental infection of salmonid fish. Journal of fish diseases. 20: 177-183.
33. **Daly J and Stevenson R. 1985.** Charcoal agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. Appl. Environ. Microbiol. 50: 868-871.

34. **Daly J & Stevenson R. 1990.** Characterization of the *Renibacterium salmoninarum* haemagglutinin. *Journal of general microbiology* 136: 949-953.
35. **De Kinkelin P, Michel C, Ghittino P. 1991.** Tratado de las Enfermedades de los Peces. 1^{ra} Edición. España: Edit. Acribia S.A. 353p
36. **Dubreuil D, Lallier R & Jacques M. 1990.** Immunoelectron microscopic demonstration that *Renibacterium salmoninarum* is encapsulated. *FEMS Microbiology Letters*. 66: 313-316.
37. **Eissa A. 2005.** Bacterial kidney disease (BKD) in Michigan salmonids. Ph.D. Dissertation, Michigan State University, East Lansing, Michigan; 210 p.
38. **Eissa A, Elsayed EE. 2006.** An Overview on Bacterial Kidney Disease. *Life Science Journal*. 3: 58-76
39. **Eissa A, Elsayed EE, McDonald R, Faisal M. 2006.** First record of *Renibacterium salmoninarum* in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Journal of Wildlife Diseases*. 42: 556-560
40. **Ekman E, Borjeson H, and Johansson N. 1999.** *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Dis. Aquat. Org.* 37: 159–163.
41. **Elliott DG, Pasco RJ. & Bullock GL. 1989.** Developments in the control of bacterial kidney disease of salmonid fishes. *Diseases of aquatic organisms* 6: 201-215.
42. **Elliott DG, Pascho RJ & Palmisano AN. 1995.** Brood stock segregation for the control of bacterial kidney disease can affect mortality of progeny chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in seawater. *Fifth International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture*. 132: 133-144
43. **Enríquez R, Ortega C, Salgado C y Vega F. 2000.** Recomendaciones para la Prevención y Control de la Necrosis Pancreática Infecciosa Viral (IPNV) en los Cultivos de Trucha. *Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico*. México. 4: 7-8
44. **Eschmeyer W. 2007.** *Catalog of Fishes-Fishbase*. California Academy of Sciences, Department of Ichthyology. [12 Noviembre 2007]. Disponible: <http://www.fishbase.org/search.php>
45. **Evelyn TPT. 1977.** An improved growth medium for the kidney disease bacterium and some notes on using the medium. *Bull. OIE*, 87: 511–513.

46. **Evelyn TPT. 1993.** Bacterial kidney disease - BKD. In: Inglis, V., Roberts, R.J. & Bromage, N.R. (Eds), Bacterial diseases of fish, Blackwell Scientific Publications, London, England. p 177-195.
47. **Evelyn, T.P.T. 1996.** Infection and disease. In: Iwama, G. & Nakanishi, T. (Eds). The fish immune system, Academic Press, San Diego, United States. p 339-366.
48. **Evelyn TPT. 1986.** Persistence of the kidney disease bacterium *Renibacterium salmoninarum* in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) eggs treated during water hardening with povidone-iodine. Journal of Fish Diseases 9: 462-464.
49. **Evelyn TPT, Kent ML, Poppe TT, and Bustos P. 1998.** Bacterial Diseases. p. 17-35. In: Diseases of Seawater Netpen-Reared Salmonid Fishes. Quadra Printers Ltd. Nanaimo. British Columbia. Canada. 138p.
50. **Evelyn TPT, Ketcheson JE. & Prosperi-Porta L. 1984.** Further evidence for the presence of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid eggs and for the failure of povidone-iodine to reduce the intraovum infection rate in water-hardened eggs. Journal of fish diseases. 7: 173-182.
51. **Evelyn TPT, Ketcheson JE, Prosperi Porta L. 1986a.** Use of erythromycin as a means of preventing vertical transmission of *Renibacterium salmoninarum*. Diseases of Aquatic Organisms. 2: 7-11.
52. **Evelyn TPT. Prosperi-Porta L, Ketcheson JE. 1986b.** Experimental intraovum infection of salmonid eggs with *Renibacterium salmoninarum* and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite treatment with erythromycin. Diseases of Aquatic Organisms. 1: 197-202.
53. **Evenden AJ, Grayson TH, Gilpin ML, Munn CB. 1993.** *Renibacterium salmoninarum* and bacterial kidney disease - the unfinished jigsaw. Annual Review of Fish Diseases. 3: 87-104.
54. **FAO. 1999.** Desarrollo de la acuicultura. Orientaciones técnicas para la pesca responsable N° 5. Roma. 54p.
55. **FAO. 2006.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. 176 p.

56. **Faure A. 1980.** Bases biotechniques et économiques de mise en place d'une gestion prévisionnelle en aquaculture. Exemple de la salmoniculture C.T.G.R.E.F. Division aménagements littoraux et aquaculture. Antenne Bretagne. 12p
57. **Ferguson H. 2006.** Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease. Second Edition. Scotian Press. London. 368 p.
58. **Flaño E, Lopez-Fiero P, Razquin B, Kaattari S, Villena A. 1996.** Histopathology of renal and splenic haemopoietic tissues of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. Diseases of Aquatic Organisms. 24: 107-115.
59. **Fredriksen A, Endresen C, Wergeland HI. 1997.** Immunosuppressive effect of a low molecular weight surface protein from *Renibacterium salmoninarum* lymphocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Shellfish Immunol. 7: 273–282.
60. **Fryer JL. 1989.** Ictiopatología. Enfermedades Bacterianas y Virales de los Peces Salmonídeos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Escuela de Postgrado. 180p.
61. **Fryer JL & Lannan CN. 1993.** The history and current status of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in Pacific salmon. Fisheries Research. 17: 15-33.
62. **Fryer JL & Sanders JE. 1981.** Bacterial kidney disease of salmonid fish. Annual review of microbiology. 35: 273-298.
63. **Getchell RG, Rohovec JS & Fryer JL. 1985.** Comparision of *Renibacterium salmoninarum* isolates by antigenic analysis. Fish pathology 20: 149-159.
64. **Godoy M. 2002.** Truchicultura. 2^{da} edición. Perú: Editorial Perú Impreso. 247p.
65. **Grayson TH, Evenden AJ, Gilpin ML, Martin KL & Munn CB. 1995.** A gene product from *Renibacterium salmoninarum* encoding a product which shows homology to bacterial zinc-metalloproteases. Microbiology 141: 1331-1341.
66. **Griffiths S, Liska K, Lynch W. 1996.** Comparison of kidney tissue and ovarian fluid from broodstock Atlantic salmon for detection of *Renibacterium salmoninarum*, and use of SKDM broth culture with Western blotting to increase detection in ovarian fluid. Diseases of Aquatic Organisms. 24: 3-9

67. **Gudmundsdottir S, Helgason S, Sigurjonsdottir H, Matthiasdottir S, Jonsdottir H, Laxdal B & Benediktsdottir E. 2000.** Measures applied to control *Renibacterium salmoninarum* infection in Atlantic salmon a retrospective study of two sea ranches in Iceland. *Aquaculture* 186: 193-203.
68. **Gutenberger SK, Duimstra JR, Rohovec JS, Fryer JL. 1997.** Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. *Diseases of Aquatic Organisms* 28: 93-106.
69. **Hamel O. 2001.** The Dynamic and effects of Bacterial Kidney Disease in Snake River spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Ph. D. Dissertation. University of Washington. Washington DC, USA. 200p.
70. **Hastein T & Lindstad T. 1991.** Diseases in wild and cultured salmon: possible interaction. *Aquaculture*. 98: 277–288.
71. **Hibiya T. 1982.** An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. First Edition Kondansha Ltd: Tokyo, Japan-Gustav Fisher Verlag: Stuttgart, New York. 147p
72. **Hicks B and Geraci J. 1984.** A histological assesment of damage in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson fed rations containing erythromycin. *Journal of Fish Diseases* 7: 457-465.
73. **Hsu H, Wooster G and Bowser P. 1994.** Efficacy of Enrofloxacin for the Treatment of Salmonids with Bacterial Kidney Disease, Caused by *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 6: 220-223.
74. **Iregui C, Hernandez E, Jiménez A, Pulido A, Rey A, Comas J, Peña L, Rodríguez M. 2004.** Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia. Bogota-Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 70 p.
75. **Jansson E. 2002.** Bacterial Kidney Disease in salmonid fish. Development of methods to assess immune functions in salmonid fish during infection by *Renibacterium salmoninarum*. Doctoral thesis. Swedish: University of Agricultural Sciences. 52 p.
76. **Jiménez S, Herrera E, Hernández E, Guarín M, Wills A, Iregui C. 2008.** Efecto de dietas isoenergéticas con diferentes niveles de proteína sobre algunos parámetros productivos y sobre algunos órganos de alevitos de tilapia *Oreochromis*

- nilotica* variedad chitralada. En: Memorias II Curso Seminario Internacional de Ictiopatología. Universidad Nacional de Colombia. p 45-49
77. **Jonsdottir H, Malmquist HJ, Snorrason SS, Gubergsson G & Gudmundsdottir S. 1998.** Epidemiology of *Renibacterium salmoninarum* in wild Arctic charr and brown trout in Iceland. J. Fish Biol. 53: 322–339.
 78. **Kaattari SL. 2000.** Bacterial Kidney Disease Vaccine Development and Immunity. Libro de Resúmenes IV Jornadas de Salmonicultura - XI Congreso de Medicina Veterinaria. Puerto Varas Chile. p 72-74.
 79. **Kaattari SL and Piganelli JD. 1997.** Immunization with bacterial antigen: Bacterial Kidney Disease. In: Symposium. Oslo, Norvege: Fish Vaccinology (nº 90): 145-152
 80. **Klontz G. 1983.** Bacterial Kidney Disease in Salmonids: An Overview. In: Anderson DP, Dorson M, Dubourget PH (Eds). Antigenes of Fish Pathogens: Development and Production for Vaccines and Serodiagnostics. Collection Fondation Marcel Merieux, Lyons, France. 3: 177-200.
 81. **Kourous G. 2007.** La acuicultura: única forma de hacer frente al futuro déficit de pescado. Sala de prensa FAO. Roma, Italia. [10 Noviembre 2007]. Disponible en: <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2007/1000701/index.html>
 82. **Kumar V, Abbas A, Fausto N. 2003.** General pathology. In: Pathologic basis of disease. 7th Edition. p 3-46.
 83. **Kusser W & Fiedler F. 1983.** Murein type and polysaccharide composition of cell walls from *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiology Letters. 20: 391-394.
 84. **Laidler LA. 1980.** Detection and identification of the bacterial kidney disease (BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique. Journal of Fish Diseases 3: 67-69.
 85. **Lall SP, Paterson WD, Hines JA, Adams NJ. 1985.** Control of bacterial kidney disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by dietary modification. Journal of Fish Diseases 8: 113-124
 86. **Larenas J. 1999.** Evaluación experimental clínico patológica del efecto de la densidad poblacional temperatura e infección concomitante con *Renibacterium salmoninarum* sobre la presentación de piscirickettsiosis. Tesis para optar al

grado de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias. Chile: Universidad de Chile. 147p.

87. **Larenas J, Bartholomew J, Troncoso O, Fernández S, Ledezma H, Sandoval N, Vera P, Contreras J, y Smith P. 2003.** Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Dis. Aquat. Org.* 56: 25–30.
88. **Larenas J, Hidalgo V, Garcés H, Fryer J, Smith P. 1995.** Piscirickettsiosis: lesiones en salmón del atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Avances en Medicina Veterinaria*. Vol.10 N°1, Enero-Junio. [20 Enero 2008]. Disponible en:
http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/CDA/avan_vet_completa/0,1424,S CID%253D10541%2526ISID%253D478,00.html
89. **Larenas J, Pérez B, Hidalgo L, Contreras J, Smith P. 1999.** Vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) under farming conditions. Abstract Book. 9th International Conference «Diseases of Fish and Shellfish». 19-24th. Rhodes Hellas. p-069.
90. **Larenas J, Zamora E y Smith P. 2005.** Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 2:59-67
91. **Le Morvan C, Troutaud D, and Deschaux P. 1998.** Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology*. 201: 165-168
92. **Leal J y Woywood D. 2007.** Piscirickettsiosis en Chile: Avances y Perspectivas para su Control. *Salmociencia*. Revista de divulgación científica y tecnológica de INTESAL. Diseases of aquatic organisms. Chile. N° 2: 34-42.
93. **Lee E, and Gordon M. 1987.** Immunofluorescence screening of *Renibacterium salmoninarum* in the tissues and eggs of farmed chinook salmon spawners. *Aquaculture*. 65: 7-14
94. **Lee E. and Evelyn TPT. 1989.** Effect of *Renibacterium salmoninarum* levels in ovarian fluid of spawning chinook salmon on the prevalence of the pathogen on their eggs and progeny. *Diseases of Aquatic Organisms*. 7: 179-184.
95. **Lim C and Webster CD. 2001.** Nutrition and fish health. 1^{ra} edition. Published By: Haworth Press. 365 p.

96. **Lindbergh J. 1993.** The Distribution of Salmon Aquaculture. Chile. p. 53. In: Salmon Aquaculture. Heen K, Monahan RL, Utter F. Fishing News Books. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 278 p.
97. **Lopez I, Cubillos V, Ernst S, Rosenfeld C. 2001.** Frecuencia y distribución, según edad y estacionalidad, de patologías hepáticas en salmonídeos, provenientes de la Xª a XIIª Región de Chile. Período 1988-1998. Arch. med. vet. 33: 193-202.
98. **Luna R, Castillo C, Sierralta A, Van Ordt G, Velásquez V. 2005.** Plan de negocios para la producción y exportación de filetes congelados de tilapia roja al mercado estadounidense. Tesis para Magíster en Administración. Lima-Perú: Universidad ESAN. 347 p.
99. **Makie TJ, Arkwright JA, Price-Tannatt TE, Mottran JC, Johnston WD & Menzies WJM. 1933.** Furunculosis Comité. Second Interim Report of the Furunculosis Committee. Edinburgh: H.M.S.O. 81p.
100. **Mantilla B. 2004.** Acuicultura: cultivo de truchas en jaulas flotantes. 1ª edición. Perú: Editora Palomino. p 34-37.
101. **Martínez J. 1996.** La perfusión de branquias como modelo de valoración de la calidad de agua y su relación con la producción intensiva de truchas. Tesis para optar al grado de Doctor en Veterinaria. España: Universidad Complutense de Madrid. 142 p.
102. **Mateo D. 1996.** La ictiofonosis y su prevalencia en las principales piscigranjas del valle del Mantaro. Tesis para optar el Título de profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor. Perú: Univ. Nacional Federico Villarreal. 145 p.
103. **Mateo E. 1972.** La ictiopatología y su importante rol en la productividad pesquera. Tesis para optar el grado de Doctor en Educación. Lima: Universidad Nacional Federico Villarreal. p 8, 55
104. **McCarthy DH, Roberts RJ. 1980.** Furunculosis of fish. The present state of our knowledge. In Droop MR, Jannasch HW. Advances in Aquatic Microbiology. 2: 293-341.
105. **McIntosh D, Austin B, Fla E, Villena A, Martínez-Pereda JA, Tarazona J. 2000.** Lack of uptake of *Renibacterium salmoninarum* by gill epithelia of rainbow trout. Journal of Fish Biology. 56: 1053-1061
106. **Miriam A, Griffiths SG, Lovely JE and Lynch WH. 1997.** PCR and probe-PCR assays to monitor broodstock Atlantic salmon ovarian fluid and kidney tissue for

- presence of DNA of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. Journal of Clinical Microbiology. 35: 1322-1326.
- 107. Mitchum DL, Sherman LE. 1981.** Transmission of bacterial kidney disease from wild to stocked hatchery trout. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 38: 547-551.
- 108. Moffitt C. 1991.** Oral and injectable applications of erythromycin in salmonid fish culture. Veterinary and Human Toxicology. 3: 49-53.
- 109. Moffitt C. 1992.** Survival of juvenile chinook salmon challenged with *Renibacterium salmoninarum* and administered oral doses of erythromycin thiocyanate for different durations. Journal of Aquatic Animal Health. 4: 119-125.
- 110. Murray CB, Evelyn TPT, Beacham TD, Banner LW, Ketcheson JE, Prospero Porta L. 1992.** Experimental induction of bacterial kidney disease in chinook salmon by immersion and cohabitation challenges. Diseases of Aquatic Organisms. 12: 91-96.
- 111. Noga E. 2000.** Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Blackwell Publishing. United States of America. 367 p.
- 112. Núñez P. 1997.** Estudio de Leucemia Linfoblástica y su asociación con otras enfermedades en salmonideos de cultivo intensivo en fase marina del Sur de Chile. Tesis para optar el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Valdivia: Universidad Austral de Chile. 50p.
- 113. O'Farrell CL, Elliott DG & Landolt ML. 2000.** Mortality and kidney histopathology of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* exposed to virulent and attenuated *Renibacterium salmoninarum* strains. Diseases of aquatic organisms 43: 199-209.
- 114. O'Farrell CL, Elliot D, Strom MS, Winton JR, Landlot ML. 1999.** In vitro and in vivo comparisons of virulent and attenuated *Renibacterium salmoninarum* strains. In: 9th International Conference. European Association of Fish Pathology.
- 115. O'Farrell CL. & Strom MS. 1999.** Differential expression of the virulence-associated protein p57 and characterization of its duplicated gene *msa* in virulent and attenuated strains of *Renibacterium salmoninarum*. Diseases of aquatic organisms. 38: 115-123.
- 116. OIE. 2000.** Enfermedad bacteriana del riñón. (*Renibacterium salmoninarum*). Aquatic Animal Enfermedad Cards. Paris-Francia. [14 Setiembre 2007]

Disponible en: <http://www.oie.int/fdc/eng/Publicat/Cardsspanish/2.2.06.BKD-E12.doc>

117. **OIE. 2006.** Renibacteriosis (*Renibacterium salmoninarum*). En: Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. 5^{ta} edición. Organización Mundial de Sanidad Animal. Paris-Francia. 469 p.
118. **OIE. 2008.** Código sanitario para los animales acuáticos. 11^{va} edición. Organización Mundial de Sanidad Animal. Paris-Francia. 238 p.
119. **Ordal EJ, Earp BJ. 1956.** Cultivation and transmission of the etiological agent of Bacterial Kidney Disease. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 92: 85-8.
120. **Ostrander G. 2000.** The laboratory fish. Academic Press, San Diego. 678 p.
121. **Pascho R and Mulcahy D. 1987.** Enzymelinked immunosorbent assay for a soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum* the causative agent of salmonid bacterial kidney disease. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44: 183-191.
122. **Pascho R and Ongerth J. 2000.** Method for flow cytometric monitoring of *Renibacterium salmoninarum* inactivation. Dis. Aquat. Org. 41:181-193
123. **Pascho R, Landolt M and Ongerth J. 1995.** Inactivation of *Renibacterium salmoninarum* by free chlorine. Aquaculture. 131: 165-175.
124. **Paterson WD, Gallant C, Desautels D, Marshall L. 1979.** Detection of Bacterial Kidney Disease in wild salmonids in the Margaree River system and adjacent waters using an indirect fluorescent antibody technique. Journal of Fisheries Research Board of Canada. 36: 1464-1468.
125. **Peddie S. 2004.** Husbandry related disease in finfish aquaculture: Nephrocalcinosis. Fish farmers. 27 (3):37
126. **Peters C. 2000.** Estudio epidemiológico de las lesiones renales de salmonideos provenientes de centros de cultivo de la X^a a la XII^a Región de Chile, y su relación con la edad y las estaciones del año, periodo 1988- 1998. Tesis M.V. Chile: Universidad Austral de Chile. 67 p.
127. **Piganelli JD, Wiens GD, Xhang JA, Christensen JM, Kaattari SL. 1999.** Evaluation of a whole cell p57-vaccine against *Renibacterium salmoninarum*. Diseases of Aquatic Organisms. 36: 37-44.

- 128. PRODUCE. 2004.** Piscicultura de la trucha. Ministerio de la Producción. Vice-Ministerios de Pesquería. Dirección Nacional de acuicultura. Lima, Perú. 17p
- 129. PRODUCE. 2008a.** Acuicultura: más que una industria de exportación. Ministerio de la Producción. Lima-Perú. 8 p
- 130. PRODUCE. 2008b.** La Acuicultura en el Perú. Ministerio de la Producción. Viceministerio de Pesquería. Lima-Perú. 10 p.
- 131. PRODUCE. 2008c.** Viceministerio de pesquería. Información sectorial. Cifras estadísticas. [20 Setiembre 2008] Acuicultura. Disponible en:
<http://www.produce.gob.pe/portal/portal/apsportalproduce/internapesqueria?ARE=3&JER=460>
- 132. PROMPEX. 2000.** Lima: Gerencia del sector pesca. Las Exportaciones y el Comercio Internacional de la Trucha. [9 Agosto 2007]. Disponible en:
http://ertic.inictel.net/img_upload/a794f58292e4c66122c43c79e4d59fd1/Las_exportaciones_y_el_comercio_internacional_de_la_Trucha.pdf
- 133. PROMPEX. 2006.** Lima: Comisión para la promoción de exportación. Oportunidad de negocios en la sierra exportadora. Gerencia de pesca y acuicultura. [12 Agosto 2007]. Disponible en:
http://export.promperu.gob.pe/Prompex/documents/sierra_exportadora/01_acuicultura.pdf
- 134. PROYECTO FIP. 2003.** Fondo de Investigación Pesquera. Riesgos de introducción de enfermedades infectocontagiosas en salmónidos. Chile: Informe Final Proyecto FIP 2001-08. 186 p.
- 135. Ramos F. 2007.** Evaluación de lesiones histopatológicas y aislamiento bacteriológico de algunos de los principales tejidos de gamitada (*Colossoma macroporum*). Tesis para optar el título de MV. Lima-Perú: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 72p
- 136. Rand TG y Cone DK. 1990.** Effects of *Ichthyophonus hoferi* on condition indices and blod chemistry of experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Wildlife Diseases. 26: 323-328.
- 137. Reimshuessel R. 2001.** A fish model of renal regeneration and development. ILAR. Journal. 42: 285-291.

- 138. Reimshuessel R, Bennett RO and Lipsky M. 1992.** Communications. A classification system for histopatological lesions. *Journal of aquatic animal health.* 4: 135-143.
- 139. Roberts RJ. 1981.** Patología de los peces. 1^{ra} edición. España: Ediciones Mundi-Prensa. 366 p.
- 140. Roberts, R, C. Shepherd. 1980.** Enfermedades de la trucha y del salmón. 1^{ra} edición. España: Edictorial Acribia. 187p.
- 141. Robohm RA, Koch RA. 1995.** Evidence for oral ingestion as the principal route of antigen entry in bath-immunized fish. *Fish Shellfish Immunol.* 5:137-150
- 142. Rockey DD, Turaga PSD, Wiens GD, Cook BA, and Kaattari SL. 1991.** Serine proteinase of *Renibacterium salmoninarum* digests a major autologous extracellular and cell-surface protein. *Can. J. Microbiol.* 37:758–763.
- 143. Rodríguez M, Rodríguez D, Monroy Y, Mata J. 2001.** Manual de enfermedades de peces. Mexico. Boletín de PRONALSA. 3: 1-14.
- 144. Roitt I. Inmunología. Fundamentos. 2003.** 10^{ma} ed. Buenos Aires: Médica Panamericana. 559 p.
- 145. Rosenthal S. 2007.** Frecuencia de Lipidosis hepática en Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. Tesis para optar el título de MV. Lima-Perú: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 74 p
- 146. Ruiz Zarzuela, Imanol, Múzquiz Moracho, José Luis, Ortega Rodríguez, Carmelo, Abadía Valleana, Rosa, Muñoz Gonzalvo, M^a Jesús, Garces Sanagustin, Angel. 2004.** Repercusión de la legislación comunitaria sobre la acuicultura española. Facultad de Veterinaria. España. Universidad de Zaragoza. 117 p.
- 147. Sakai M and Kobayashi M. 1992.** Detection of *Renibacterium salmoninarum* the causative agent of Bacterial Kidney Disease in salmonid fish, from pen cultured coho salmon. *Applied and Environmental Microbiology.* 58: 1061- 3.
- 148. Sakai M, Atsuta S, and Kobayashi M. 1992.** Detection of *Renibacterium salmoninarum* Antigen in Migrating Adult Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases.* 28: 110-112.
- 149. Sakai M, Atsuta S, and Kobayashi M. 1991.** Susceptibility of five salmonid fishes to *Renibacterium salmoninarum*. *Gyobyu kenkyu.* 26: 159-160.

150. **Sakai M, Ogasawara K, Atsuta S. and Kobayashi M. 1989.** Comparative sensitivity of carp, *Cyprinus carpio* L. and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to *Renibacterium salmoninarum*. Journal of fish diseases 12: 367-372.
151. **Sakai M, Terutoyo Y, Masanori K. 1995.** Influence of the immuno-stimulant, EF203, on the immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to *Renibacterium salmoninarum*. Aquaculture 138: 61-7.
152. **Sami S, Fischer-Scherl T, Hoffman RW, Pfeil-Putzien C. 1992.** Immune complexmediated glomerulonephritis associated with bacterial kidney disease in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Pathology. 29: 169-174.
153. **Sanders J and Barros M. 1986.** Evidence by the Fluorescent Antibody Test for the Occurrence of *Renibacterium salmoninarum* among Salmonid Fish in Chile. Journal of Wildlife Disease 22: 255-257
154. **Sanders JE and Fryer JL. 1980.** *Renibacterium salmoninarum* gen. nov. sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes. International journal of systematic bacteriology. 30: 496-502.
155. **Secombes C. 1985.** The in vitro formation of teleost multinucleate giant cells. Journal of Fish Disease. 8: 461-464.
156. **Shimazu K, Puchi MH. 1984.** Enfermedad Bacteriana del Riñón en Ensenada y Puerto Aguirre XI Región. Informe de Circulación Restringida SERNAP y JICA. (12): 9 p.
157. **Smith IW. 1964.** The occurrence and pathology of Dee disease. Scot. Dept. Agr. Fish. Freshwater and Salmon Fisheries Research. Her Majesty's Stationery Office, Edinburgh. 34: 1-12.
158. **Smith PA. 2000.** Mecanismos de Infección de Patógenos Bacterianos en Peces Salmonídeos. Libro de Resúmenes IV Jornadas de Salmonicultura-XI Congreso de Medicina Veterinaria. Puerto Varas-Chile. p 61-64.
159. **Smith, G and Stearley R. 1989.** The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trouts. Fisheries. 14: 4-10.
160. **Smith P, Larenas J, Vera P, Contreras J, Venegas C, Rojas M, Guajardo A. 2001.** Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. Monografías de Medicina Veterinaria. 21 (2).
161. **Solar Y and Evelyn T. 1991.** La enfermedad del riñón, medidas para evitar su propagación en Chile. Aquanoticias Internacional. 9: 54 - 57.

162. **Spiegel M. 1991.** Estadística. 2^{da} edición. EEUU: Mc Graw Hill. 556 p.
163. **Stackebrandt E, Rainey F and Ward-Rainey N. 1997.** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int J Syst Bacteriol. 47: 479-491
164. **Stackebrandt E, Wehmeyer U, Nader H and Fiedler F. 1988.** Phylogenetic relationship of the fish pathogenic *Renibacterium salmoninarum* to *Arthrobacter*, *Micrococcus* and related taxa. FEMS Microbiology Letters. 50, 117-120.
165. **Starliper CE, Smith DR, Shatzer T. 1997.** Virulence of *Renibacterium salmoninarum* to salmonids. Journal of Aquatic Animal Health. 9: 1-7.
166. **Stevenson J. 1985.** Manual de cría de la trucha. 1^{ra} edición. Zaragoza. España: Editorial Acribia S.A. 232 p.
167. **Stevenson RMW. 1999.** Bacterial Diseases In Coldwater Aquaculture: Tracking Pathogens. Microbial Interactions in Aquaculture. Canada. p1-6 [18 Junio 2008] Disponible en: <http://socrates.acadiau.ca/isme/Symposium08/stevenson.PDF>
168. **Suárez DA. 1997.** Caracterización Clínica y Patológica de la Leucemia Linfoblástica en salmones y truchas de cultivo. Tesis, M.V. Chile: Universidad Austral de Chile.
169. **Suzumoto BK, Schreck CB, McIntyre JD. 1977.** Relative resistances of three transferring genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to Bacterial Kidney Disease. Journal of Fisheries Research Board of Canada. 34: 1-8.
170. **Tacón A. 2007.** Aquafeed Int.; Global Aquaculture production highlights and estimated compound aquafeed use in 2005. International Aquafeed. 10: 40-44.
171. **Tizard I. Inmunología veterinaria. 1998.** Quinta edición. Mexico: Editorial Mc Graw Hill Interamericana. 567 p.
172. **Trenzadero C. 2004.** Selección parenteral y dieta como estrategias de atenuación del estrés crónico en la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972). Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. España: Univ. de Granada. 371p.
173. **Turaga P, Wiens G. & Kaattari S. 1987.** Bacterial kidney disease: the potential role of soluble protein antigen(s). Journal of fish biology. 31: 191-194.
174. **Udey LR, Freyer JL. 1978.** Inmunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. Mar. Fish. Rev. 40: 12 - 17.

- 175. USDA. 2007.** Assessing Infectious Disease Emergence Potential in the U.S. Aquaculture Industry. Phase 1: U.S. Aquaculture Industry Profile. United States Department of Agriculture. 54p
- 176. VanderKooi S and Maule A. 1999.** Prevalence of *Renibacterium salmoninarum* in Juvenile Spring Chinook Salmon at Columbia and Snake River Hatcheries, 1993-1996. *Journal of Aquatic Animal Health.* 11: 162–169
- 177. Vega LF. 2004.** Aspectos morfológicos e histológicos del riñón de la trucha arco iris. Programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco-México. *Boletín de PRONALSA.* 4: 7-9.
- 178. Wayne D. 1996.** Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 5^{ta} edición. México: Editorial Limusa S.A. de C.V. Grupo Noriega editores. 878 p.
- 179. Wiens G.D. & Kaattari SL. 1991.** Monoclonal antibody characterization of a leukoagglutinin produced by *Renibacterium salmoninarum*. *Infection and immunity.* 59: 631-637.
- 180. Winter GW, Schreck CB, McIntyre JD. 1980.** Resistance of different stocks and transferrin genotypes of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* , and steelhead trout , *Salmo gairdneri* , to Bacterial Kidney Disease and vibriosis. *United States National Marine Fisheries Service Fishery Bulletin;* 77: 795-802.
- 181. Wolf K, Dunbar CE. 1959.** Tests of 34 therapeutic agents for control of Kidney Disease in t rout. *Transactions of the American Fisheries Society.* 88: 117-24
- 182. Wood E, Yasutake W. 1956.** Histopathology of Kidney Disease in fish. *American Journal of Pathology.* 32: 845-857.
- 183. Woolke, R. 1975.** Pathologu of bacterial and fangal diseases affecting fish. In *The Pathology of fishes*, ed. W. E. Ribelin & G. Migaky, pp 33-116. Madison Wis; University of Winsconsin Press.
- 184. Young CL., Chapman GB. 1978.** Ultrastructural aspects of the causative and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of Fisheries Research Board of Canada.* 35: 1234-1248.
- 185. Zarzuelo E. 1981.** Principales enfermedades infecciosas de los peces. Editorial Aedos. España. 175 p.

IX. APÉNDICE

Cuadro A1. Características clínicas y lesiones macroscópicas externas en Truchas
Arcoiris clínicamente enfermas

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LESIONES MACROSCÓPICAS	Total	%
Melanosis total	4/33	12.1
Melanosis parcial	29/33	87.9
Piel ulcerada	1/33	3.0
Piel con cicatriz	2/33	6.1
Pez nado lento y superficial	19/33	57.6
Pez nado lento a media agua	1/33	3.0
Pez orillado	2/33	6.1
Pez en fondo	12/33	36.4
Exoftalmia unilateral	1/33	3.0
Anoftalmia unilateral	1/33	3.0
Alteración de aletas	7/33	21.2
Palidez branquial	17/33	51.5
Alteración de columna	5/33	15.2

Cuadro A2. Pesos, tallas, sexo y resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) de las Truchas Arcoiris

Pez N°	Peso (g)	Talla (cm)	Sexo	IFI
1	180	24	M	Neg
2	150	23	H	Neg
3	170	24	M	Neg
4	140	21	H	Neg
5	140	21	M	Neg
6	120	20	H	Neg
7	150	22	H	Neg
8	120	21	H	Neg
9	150	22	H	Neg
10	160	23	H	Neg
11	120	21	H	Pos
12	110	20	H	Neg
13	130	21	M	Neg
14	60	17	M	Neg
15	130	21	H	Pos
16	100	19	H	Pos
17	170	24	M	Pos
18	160	23	H	Neg
19	60	16	H	Neg
20	140	22	H	Neg
21	145	23	H	Neg
22	180	24	H	Neg
23	170	24	H	Pos
24	180	24	H	Neg
25	80	18	H	Neg
26	180	24	H	Neg
27	170	24	H	Neg
28	170	24	H	Neg
29	150	23	H	Neg
30	180	24	H	Neg
31	170	24	M	Neg
32	170	24	M	Neg
33	180	23	H	Neg
PROMEDIO	145	22.06		5

Pos: Positivo

Neg: Negativo

Cuadro A3. Pesos, tallas, sexo y resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) de las Truchas Arcoiris positivos a *Renibacterium salmoninarum*, determinadas por IFI

Pez N°	Peso (g)	Talla (cm)	Sexo	IFI
11	120	21	H	Pos
15	130	21	H	Pos
16	100	19	H	Pos
17	170	24	M	Pos
23	170	24	H	Pos
Promedio	138	21.80		5

Pos: Positivo

Cuadro A4. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de las porciones anteriores de riñones en Truchas Arcoiris negativas a *Renibacterium salmoninarum* por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

TIPO DE TRASTORNO	GRADO				ALTERACIONES	
	I	II	III	IV	Total	%
Trastornos necróticos						
Linfocitólisis	0	0	1	0	1/28	3.6
Trastornos inflamatorios						
Aumento CMM	6	7	2	0	15/28	53.6
Granuloma	0	4	0	0	4/28	14.3
Granuloma con espora de hongo	6	5	0	0	11/28	39.3
Células epitelioides	2	1	0	0	3/28	10.7
Células multinucleadas	3	2	0	0	5/28	17.9
Trastorno circulatorio						
Congestión	2	5	2	0	9/28	32.1

CMM: Centros melanomacrófagos.

Cuadro A5. Frecuencia de lesiones histopatológicas de cuerpos renales en Truchas Arcoiris negativas a *Renibacterium salmoninarum* por inmunofluorescencia indirecta

Lesiones del cuerpo renal	Grado				Total	%
	I	II	III	IV		
Trastornos degenerativos						
Degeneración gotas hialinas en túbulos renales	9	4	2	1	16/28	57.1
Degeneración vacuolar túbulos renales	4	2	1	0	7/28	25.0
Trastornos necróticos						
Necrosis coagulativa de túbulos renales	2	2	1	2	7/28	25.0
Trastornos inflamatorios						
Aumento CMM	3	12	3	0	18/28	64.3
Granuloma	2	6	0	0	8/28	28.6
Granuloma con espora de hongo	3	5	0	2	10/28	35.7
Células epitelioides	2	1	0	0	3/28	10.7
Células multinucleadas	3	0	0	0	3/28	10.7
Trastorno circulatorio						
Congestión	0	1	1	0	2/28	7.1
Trastorno de crecimiento, regeneración y adaptación						
Hiperplasia tubular	1	0	0	0	1/28	3.6
Engrosamiento membrana basal glomérulo	0	1	0	0	1/28	3.6
Regeneración tubular	7	3	0	0	10/28	35.7

CMM: Centros melanomacrófagos

Cuadro A6. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de branquias en Truchas Arcoiris negativas a *Renibacterium salmoninarum*

TIPO DE TRASTORNO	GRADO				ALTERACIONES	
	I	II	III	IV	Total	%
Trastornos degenerativos						
Degeneración lamelas secundarias	0	1	0	0	1/28	3.6
Trastornos necróticos						
Necrosis coagulativa lamelas secundarias	1	0	0	0	1/28	3.6
Trastornos inflamatorios						
CGE en lamelas primarias	8	4	0	0	12/28	42.9
Trastorno circulatorio						
Congestión lamelas primarias	0	4	0	1	5/28	17.9
Telangiectasia lamelas primarias	0	0	1	0	1/28	3.6
Telangiectasia lamelas secundarias	3	1	0	0	4/28	14.3
Edema lamelas secundarias	2	1	0	0	3/28	10.7
Trastorno de crecimiento y adaptación						
Hiperplasia lamelas primarias	0	0	1	0	1/28	3.6
Atrofia lamelas primarias	2	3	1	0	6/28	21.4
Hiperplasia interlamelar	3	11	10	0	24/28	85.7
Atrofia lamelas secundarias	5	11	6	0	22/28	78.6
Fusión lamelas secundarias	3	7	7	0	17/28	60.7

CGE: Células Granulares Eosinofílicas

Cuadro A7. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de branquias de Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum*

TIPO DE TRASTORNO	GRADO				ALTERACIONES	
	I	II	III	IV	Total	%
Trastornos inflamatorios						
CGE en lamelas primarias	1	2	1	0	4/5	80
Trastorno circulatorio						
Congestión lamelas primarias	0	2	1	0	3/5	60
Telangiectasia lamelas secundarias	0	1	0	0	1/5	20
Edema lamelas secundarias	1	0	0	0	1/5	20
Trastorno de crecimiento y adaptación						
Atrofia lamelas primarias	0	1	0	0	1/5	20
Hiperplasia interlamelar	2	2	0	1	5/5	100
Atrofia lamelas secundarias	0	0	3	1	4/5	80
Fusión lamelas secundarias	0	1	3	1	5/5	100

CGE: Células Granulares Eosinofílicas

Cuadro A8. Valores establecidos para severidad y extensión en degeneración grasa en hígado

Grado	Severidad	Extensión
I	Escasa presencia de microvacuolas predominantemente de borde definido (se mantiene la arquitectura del hepatocito).	Multifocal, hasta el 25% de toda la muestra.
II	Leve presencia de micro y/o macrovacuolas de borde definido con mayor compromiso de las células hepáticas.	Multifocal, del 25% hasta 50% aproximadamente de toda la muestra.
III	Moderada presencia de macro y microvacuolas de borde definido, núcleo, ligeramente desplazado con ligera distorsión de la arquitectura del hepatocito.	Difuso, del 50% hasta 75% aproximadamente de toda la muestra.
IV	Severa presencia de macrovacuolas dentro del citoplasma del hepatocito, núcleo aplanado y ligeramente ovalado. Pérdida de la citoarquitectura de los hepatocitos y se encuentran muy unidos entre si.	Difuso, del 75% hasta aproximadamente el 100% de toda la muestra.

Fuente: adaptado de Bernet *et al.*, (1999)

Cuadro A9. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de hígados de Truchas
Arcoiris negativas a *Renibacterium salmoninarum*

TIPO DE TRASTORNO	GRADO				ALTERACIONES	
	I	II	III	IV	Total	%
Trastornos degenerativos						
Degeneración grasa	1	6	6	3	16/28	57.1
Trastornos necróticos						
Necrosis coagulativa	1	8	2	1	12/28	42.9
Trastornos inflamatorios						
Granuloma	2	5	1	0	8/28	28.6
Granuloma con espora de hongo	1	2	0	1	4/28	14.3
Células epitelioides	6	1	0	0	7/28	25.0
Células multinucleadas	1	2	0	0	3/28	10.7
Tejido conectivo	0	1	0	0	1/28	3.6
Acumulo mononuclear	1	1	0	0	2/28	7.1
Trastorno circulatorio						
Congestión	2	3	2	0	7/28	25.0
Edema	0	1	0	0	1/28	3.6
Extravasación de glóbulos rojos	0	1	0	0	1/28	3.6

Cuadro A10. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de hígados de Truchas
Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum*

TIPO DE TRASTORNO	GRADO				ALTERACIONES	
	I	II	III	IV	Total	%
Trastornos degenerativos						
Degeneración grasa	1	1	0	1	3/5	60
Trastornos necróticos						
Necrosis coagulativa	1	0	1	0	2/5	40
Trastornos inflamatorios						
Granuloma	0	1	0	0	1/5	20
Granuloma con espora de hongo	0	1	0	0	1/5	20
Células multinucleadas	0	1	0	0	1/5	20
Trastorno circulatorio						
Congestión	0	0	1	0	1/5	20

Cuadro A11. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de bazos de Truchas Arcoiris negativas a *Renibacterium salmoninarum*

TIPO DE TRASTORNO	GRADO				ALTERACIONES	
	I	II	III	IV	Total	%
Trastornos inflamatorios						
Granuloma	0	1	0	0	1/28	3.6
Granuloma con espora de hongo	1	1	0	0	2/28	7.1
CGE	1	0	0	0	1/28	3.6
CMM	6	1	0	0	7/28	25.0
Células multinucleadas	1	0	0	0	1/28	3.6
Trastorno circulatorio						
Congestión	2	6	13	2	23/28	82.1
Trastorno de crecimiento y adaptación						
Disminución linfoide	2	3	1	0	6/28	21.4

CGE: Células granulares eosinofílicas

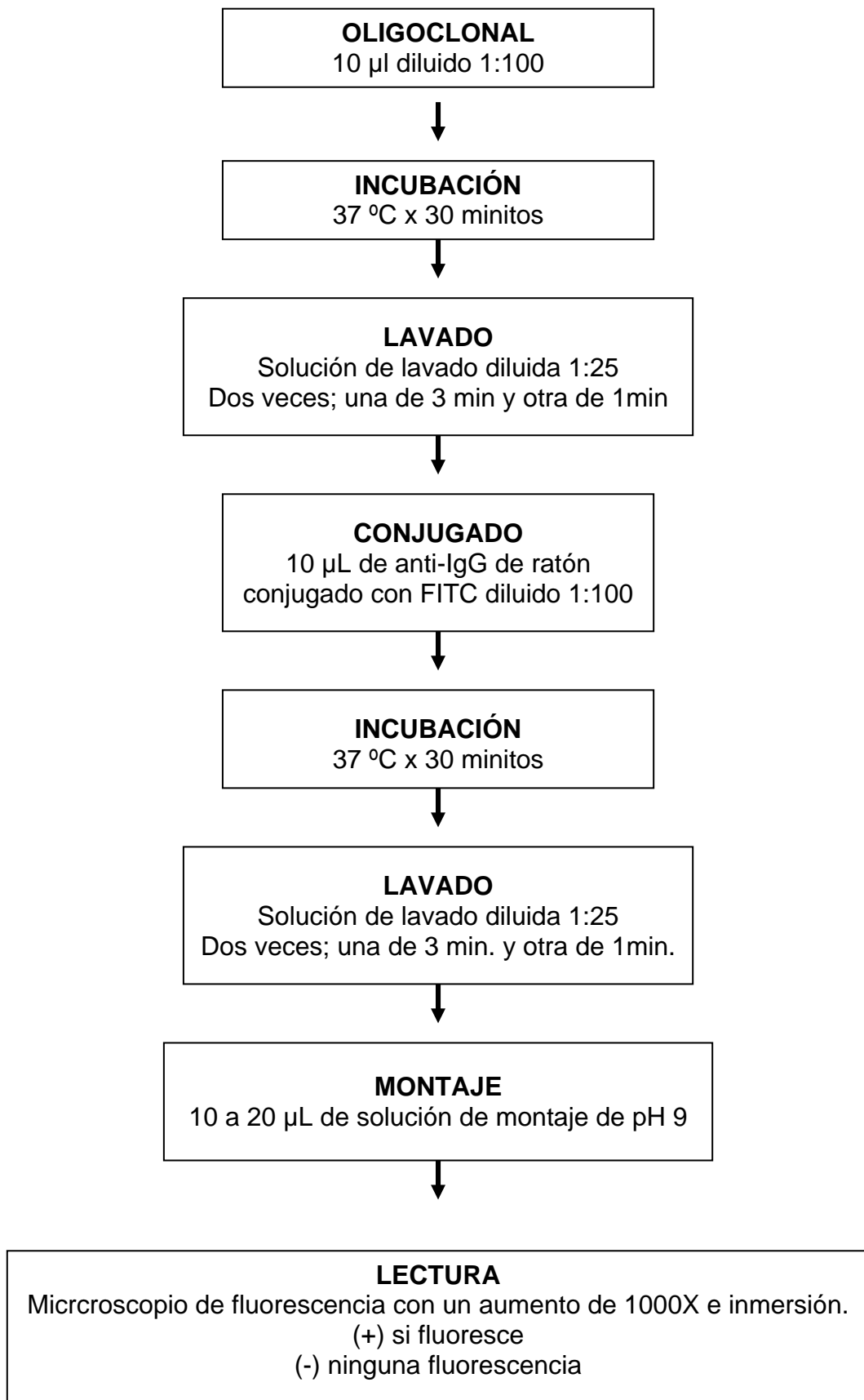
CMM: Centros melanomacrófagos

Cuadro A12. Frecuencia de alteraciones histopatológicas de bazos de Truchas Arcoiris positivas a *Renibacterium salmoninarum*

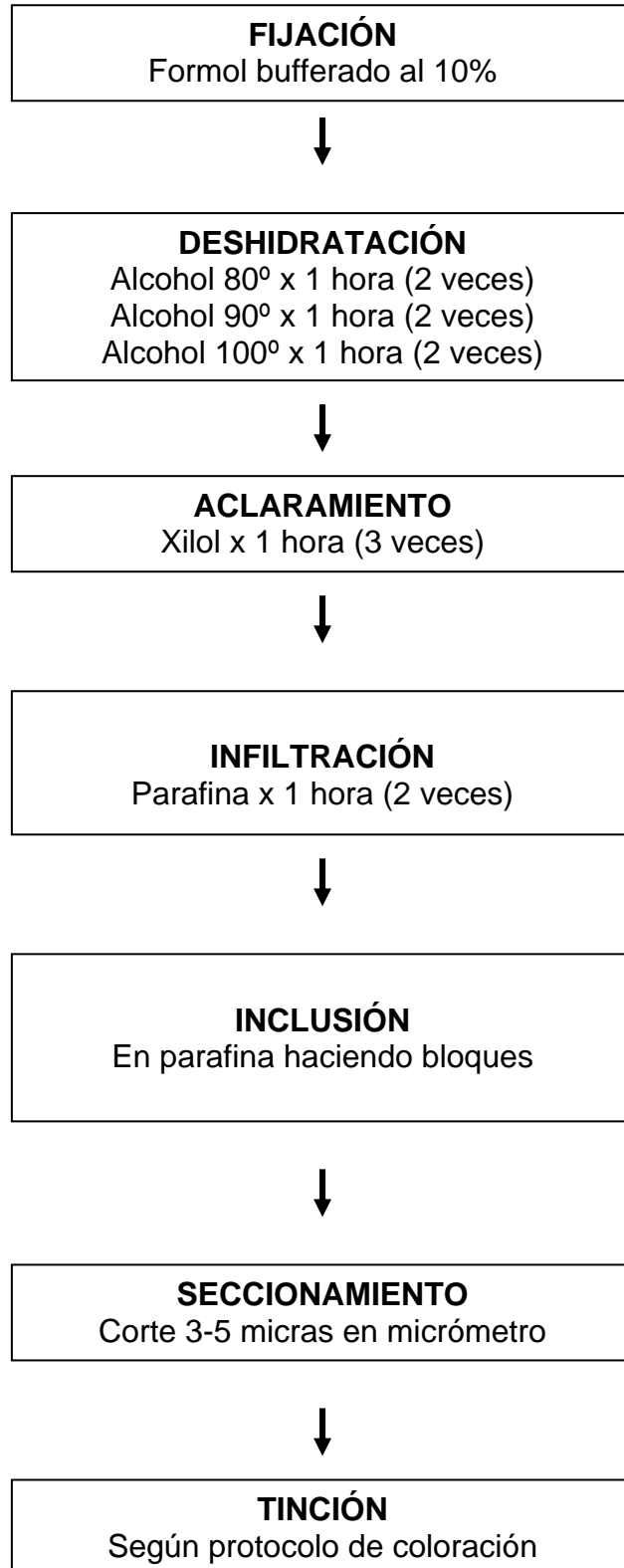
TIPO DE TRASTORNO	GRADO				ALTERACIONES	
	I	II	III	IV	Total	%
Trastornos inflamatorios						
Granuloma	0	1	0	0	1/5	20
CMM	1	0	0	0	1/5	20
Trastorno circulatorio						
Congestión	0	0	3	1	4/5	80
Trastorno de crecimiento y adaptación						
Disminución linfoide	0	1	0	0	1/5	20

CMM: Centros melanomacrófagos

Anexo A1. Inmunofluorescencia Indirecta para BKD



Anexo A2. Procesamiento histológico de las muestras



Anexo A3. Materiales y equipos

Para coleccionar especimenes

- Malla o carcal.
- Tijera para sacrificio.
- Recipiente para colocar truchas moribundas.
- Bolsas plásticas.
- Plumón indeleble.
- Guantes.
- Termómetro.
- Cintas de pH (pH – FIX 0-14. Mancherky-Nagel) 100 tiras con indicadores coloridos.

Necropsia

- Alcohol de 70°.
- Tijeras.
- Pinzas planas.
- Bisturí.
- Bandeja.
- Papel toalla.

Histopatología

- Hoja de bisturí.
- Tijera.
- Frascos con tapa hermética.
- Formol tamponado al 10%.
- Alcohol de 70°.
- Bandeja.
- Papel toalla.
- Plumón indeleble.
- Microscopio óptico con objetivos de 10X, 40X y 100X (inmersión).
- Cámara digital para las microfotografías.

Inmunofluorescencia indirecta

- Kit de inmunofluorescencia indirecta de BIOS Chile
- Microscopio de lectura de inmunofluorescencia con objetivo de 100X.
 - Aceite de inmersión.
 - Cámara con rollo ASA 1600.
 - Bolsas de plástico.
 - Lámina portaobjetos.
 - Coplin de vidrio.
 - Xilol.
 - Isopos.
 - Estufa

Anexo A4. Protocolo de coloración de hematoxilina y eosina

La tinción de los cortes va a permitir estudiar y conocer las características físicas de las muestras y las relaciones entre las células que lo constituyen. Se utilizó la tinción ordinaria más utilizada en histología que es de Hematoxilina - eosina (H-E) que son colorantes de contraste. La hematoxilina, que permite observar las estructuras físicas del núcleo, y la eosina, que permite distinguir los detalles del citoplasma de las células.

En primer lugar los cortes se sumergieron en el primer baño de xileno durante tres minutos. Se pasaron al segundo baño de xileno por dos minutos, se dejó escurrir el exceso de solución inclinando el soporte y dejándolo en contacto con el borde del recipiente. Luego se llevó al primer baño de alcohol etílico absoluto durante dos minutos. Posteriormente se sumergieron en un baño de alcohol etílico de 95° durante dos minutos.

Sucesivamente se sumergieron en alcohol de 70° por uno a dos minutos. Una vez realizados los baños con alcohol se procedió a hidratar los cortes sumergiéndolos en un frasco con agua destilada por uno a dos minutos. Luego se realizó la tinción durante 5 minutos con hematoxilina. Sucesivamente se aclaró sumergiendo la preparación tres veces en alcohol ácido al 1 por 100. Para finalmente enjuagar en agua.

Se colocaron las muestras en carbonato de litio al 1 por 100 por 30 segundos para azular.

Se enjuagó con agua corriente.

Se procedió a teñir con Eosina durante 30 segundos.

Se enjuagó rápidamente con alcohol de 80°

Se lavó con agua corriente por 30 segundos.

Se procedió a deshidratar en tres baños sucesivos de alcohol etílico absoluto de 20 segundos cada uno.

Se pasó por tres baños de xileno de 15 segundos cada uno.

Finalmente se procedió a montar la preparación con bálsamo de Canadá y se colocó una lámina cubreobjetos para conservación de la muestra y mejor observación.

Cuadro A13. Denominación, talla y peso considerados en centro piscícola

Denominación	Talla (cm)	Peso (g)
Alevín	3-10	1.5-20
Juveniles	10-15	20-60
Precomercial	15-24	60-180
Comercial	24-30	180-250

Cuadro A14. Promedio de pH de las pozas de estudio

pH	
Hora	Valor
6:00 am	6.9
12:00 pm	7.9
18:00 pm	7.1
Promedio	7.3

Cuadro A15. Promedio de temperatura de las pozas de estudio

Temperatura (°C)	
Hora	Valor
6:00 am	9.8
12:00 pm	11.8
18:00 pm	10.7
Promedio	10.8