



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“*Flavobacterium psychrophilum* COMO PATÓGENO
EMERGENTE EN PISCICULTURA”

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SAÚL MATA LÓPEZ

ASESORES

Dr. CÉSAR ORTEGA SANTANA
Dr. BENJAMÍN VALLADARES CARRANZA
M en C. ALMA YANINE CASTILLO MIRANDA

REVISORES:

M. en C. Luis Fernando Vega Castillo

M. en C. Ada Elia Díaz Borja

TOLUCA, MÉXICO; SEPTIEMBRE DE 2017



DEDICATORIA

A Dios.

A quien le agradezco y reconozco,
por brindarme la oportunidad y
cumplir mis metas en la vida.

A mis padres y hermana:

José Antonio Mata Téllez

María del Pilar López Juárez, y

Mariana Mata López

Quienes me brindaron parte de la guía
y el camino.

Que con sus buenos consejos me han
ayudado para poder llegar a este punto
de mi carrera.

Y con su ejemplo, dedicación, palabras
de aliento me motivaron y nunca bajaron
los brazos para que yo tampoco lo haga.

A mi novia:

Verónica Martínez Hernández

Por el apoyo moral e incondicional
que me ha brindado, para que yo
pueda salir adelante a pesar de
la adversidad y los problemas que
acontecen día a día.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, por la grandiosa oportunidad que me ha brindado de formar parte de ella y concluir mis estudios.

A mis asesores: Dr en C.A. Benjamín Valladares Carranza, Dr en C. Cesar Ortega Santana y M en C. Alma Castillo Miranda. Por la confianza depositada en mi para la realización del presente trabajo.

A mis revisores: M. en C. Ada Elia Díaz Borja y M. en C. Luis Fernando Vega Castillo. Por su tiempo dedicado y las sugerencias hechas.

Y a todas aquellas personas que fueron parte del camino y que de manera directa o indirectamente pusieron una parte de ellos en mi formación profesional.

**“*Flavobacterium psychrophilum* COMO PATÓGENO
EMERGENTE EN PISCICULTURA”.**

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	6
OBJETIVOS	8
MATERIAL	9
MÉTODO	10
Capítulo I. La piscicultura	11
La trucha arcoíris	14
Capítulo II. Generalidades sobre enfermedades bacterianas en piscicultura.....	16
Capítulo III. Procesos patológicos ocasionados por <i>Flavobacterium</i> spp en trucha arcoíris	18
Síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS)	19
Signos clínicos	20
Transmisión	21
Hospederos	22
Agente causal: <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	22
Distribución	24
Factores de virulencia	24
Patogenicidad	25
Diagnóstico	29
Caracterización y tipificación de <i>F. psychrophilum</i>	31
Control y prevención	32
CONCLUSIONES	36
SUGERENCIAS	37
LÍMITE DE ESPACIO	38
LÍMITE DE TIEMPO	39
LITERATURA REVISADA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Crías de trucha arcoíris con RTFS. Presentan oscurecimiento corporal, distensión abdominal, exoftalmia e incoordinación.....	21
2. Cría de trucha arcoíris con signos de enfermedad de la montura y enfermedad del pedúnculo.....	26
3. Crías de trucha arcoíris con RTFS. Palidez generalizada, ascitis, líquido en estómago, oscurecimiento corporal y exoftalmia moderada.....	27
4. Cría de trucha arcoíris con RTFS. Palidez generalizada y hemorragia en bazo.....	27
5. Cría de trucha arcoíris con necrosis y pigmentación amarillenta del bazo.....	28
6. Corte histológico de cría de trucha arcoíris afectada con RTFS. Se observa necrosis esplénica y engrosamiento de la capsula; necrosis muscular de pared costal aledaña al bazo. 10X. H&E.....	28

RESUMEN

Saúl Mata López. “*Flavobacterium psychrophilum* como patógeno emergente en piscicultura”. (bajo la dirección de: Dr. César Ortega Santana, Dr. Benjamín Valladares Carranza y M en C. Alma Yanine Castillo Miranda)

En el trabajo se describen las características biológicas de *F. psychrophilum* y los procesos patológicos que provoca, con énfasis en el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS), describiendo su distribución geográfica, los signos clínicos y lesiones que muestran los animales afectados, los aspectos epidemiológicos, las medidas de prevención, control y tratamiento. Se describen también los aspectos de los procesos de diagnóstico para la identificación de la enfermedad, el cultivo y las estrategias para el aislamiento del agente; dicha información tiene la intención de que sea una rápida y confiable fuente de consulta para productores, técnicos acuícolas y a las autoridades e instancias sanitarias en materia de piscicultura, para que ante la aparición de las primeras sospechas de la presencia de esta enfermedad que a nivel mundial se considera una de las que más impactan a la industria de la trucha arcoíris, puedan realizar una identificación oportuna y en consecuencia aplicar las medidas de prevención y control. En la actualidad, la piscicultura se ha destacado como una actividad de gran importancia a nivel mundial; entre sus bondades, los productos obtenidos por piscicultura son de mejor calidad sanitaria que los obtenidos de pesca o captura; también tiene gran importancia económica y social ya que ofrece fuentes de trabajo durante todo el proceso de crianza y recolección ya sea de forma directa o indirecta. Sin embargo, su auge se ha visto acompañado de la ocurrencia de enfermedades infecciosas que a nivel global generan pérdidas tanto económicas como de producción. En el cultivo de peces, un agente de gran importancia es *Flavobacterium psychrophilum*, bacteria común de aislar durante los procesos patológicos conocidos como podredumbre de las aletas y en la enfermedad del pedúnculo, muy comunes de observar en la trucha arcoíris y otras especies de peces salmónidos considerados de agua fría. En este proceso, la bacteria, invade el borde de las aletas o la cola, y por rozamiento con alguna lesión o solución de continuidad se logra la infección que permite al microorganismo causar lesiones severas, particularmente de tipo necrótico en la piel. En especies salmonídeas, *F. psychrophilum* también ocasiona el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS), enfermedad septicémica que afecta a los peces de primera alimentación, causando oscurecimiento corporal, anorexia, exoftalmia uni o bilateral, branquias pálidas, abultamiento abdominal. En casos de mayor severidad, se exhibe descamación completa de la aleta caudal con exposición de la espina en el área del pedúnculo caudal. Aunque esta bacteria afecta principalmente a peces salmonídeos, existe la posibilidad de que peces no salmónidos desempeñen un rol de hospedero de transporte o portadores. Estas bacterias pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo en agua de río, adoptando distintos mecanismos para sobrevivir a la falta de nutrientes. Ante la falta de vacunas eficientes contra RTFS, a la fecha la mejor forma de control de este patógeno es aplicar las buenas prácticas de producción y

de prevención, dejando por última opción el uso de terapias antimicrobianas. La FDA (*Food and Drug Administration: Administración de Medicamentos y Alimentos*), únicamente autoriza el uso de oxitetraciclina, florfenicol y sulfonamidas como antibióticos para uso en piscicultura. Sin embargo, en la práctica se utilizan otros productos con resultados generalmente poco exitosos, por lo que la recomendación general es la prevención ya que el uso indiscriminado de antibióticos puede ser desfavorable por el alto costo y el daño potencial e impacto a la salud humana y al medio.

Palabras clave: *F. psychrophilum*, trucha arcoíris, piscicultura.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la acuicultura se ha intensificado y diversificado notablemente, y asociado a ello es común que en las especies cultivables aparezcan agentes infecciosos que pueden causar enfermedades; que son procesos que ocurren dadas las condiciones ambientales a las cuales los peces están expuestos, al tiempo de crecimiento y el constante intercambio de especímenes entre una granja y otra (CONAPESCA, 2007 y 2008).

Internacionalmente las enfermedades constituyen un grave problema para el desarrollo y sostenimiento de la acuicultura, ya que independientemente de que si aparecen de forma esporádica, periódica o sostenida son una limitante para la producción. Asimismo, existen enfermedades que pueden manifestarse en forma asintomática sin ocasionar daños visibles, o se presentan desarrollando un cuadro clínico típico de una enfermedad que después de su aparición puede desaparecer o bien seguir un curso crónico. De igual forma, existen enfermedades con características muy específicas fáciles de identificar, mientras que hay otras que tienen distintas maneras de presentarse, lo cual hace que su diagnóstico sea complicado, e incluso muchas veces una vez que se manifiesta la enfermedad ocasionada por cierto patógeno, estos tienden a confundirse con otros agentes complicando el diagnóstico, el control, y tratamiento, lo que se ve reflejado en la disminución de la rentabilidad del cultivo (LGPAS, 2007; Ortega y Valladares, 2015).

En peces las enfermedades pueden ser de distinta etiología: bacterianas, virales, micóticas, parasitarias, neoplasias y congénitas en donde la signología clínica puede ser indistinta, y aquellas relacionadas con el estado nutritivo; en algunas otras la manifestación clínica puede ser característica, sin embargo siempre se requiere la confirmación del agente involucrado en el proceso de enfermedad (LGPAS, 2007; OIE, 2012).

Dentro de las enfermedades bacterianas más comunes que afectan a peces destacan la furunculosis causada por *Aeromonas salmonicida* subespecie

salmonicida; la septicemia hemorrágica que puede ser causada por *Aeromona hydrophila* y otras *Aeromonas* sp, así como por *Pseudomonas* sp; la enfermedad bacteriana del riñón causada por *Renibacterium salmoninarum*; la septicemia entérica del bagre cuyo agente etiológico es *Edwardsiella ictaluri*; septicemias estreptocócicas en donde están involucradas diferentes bacterias del género *Streptococcus* así como otros géneros incluido *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus* y *Weissella ceti* entre otros; la enfermedad entérica de la boca roja provocada por *Yersinia ruckeri* y distintas modalidades de Flavobacteriosis causadas por bacterias del género *Flavobacterium* (Wolke, 1975; Brown, 2000).

En este sentido, las bacterias Gram negativas suelen ser los patógenos más frecuentes para peces y algunas de ellas pueden considerarse como predilectas para alguna especie o para alguna etapa de desarrollo del pez. Así por ejemplo, *Renibacterium salmoninarum* es un agente patógeno común y casi exclusivo para peces salmónideos; mientras que *Flavobacterium* spp generalmente afecta a nivel branquial, piel y aletas de casi todo tipo de peces, y en peces salmónidos menores provoca el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS por sus siglas en inglés de *Rainbow Trout Fry Syndrome*), una septicemia de gran importancia sanitaria en estas especies (Hirsh *et al.*, 2004; Glenn y Post, 2005).

El grupo de las *Flavobacterias* son bacterias psicotrópicas que tienen predilección por peces salmónidos, morfológicamente son bacilos filamentosos, Gram negativos que pueden provocar procesos patológicos conocidos como: la enfermedad de las branquias (*F. branchophilum*), enfermedad de la columna (*F. columnare*), y enfermedad de las aguas frías o síndrome del alevín de la trucha (*F. psychrophilum*), patologías que son de importancia clínica y económica debido a las manifestaciones clínicas severas que provocan en los peces (Hirsh *et al.*, 2004; Glenn y Post, 2005).

Las bacterias del género *Flavobacterium* pueden afectar tanto a peces jóvenes como adultos. En una manifestación externa que puede observarse en peces de cualquier edad, *Flavobacterium branchophilum* es responsable de una

enfermedad que principalmente afecta salmónidos, comúnmente conocida como enfermedad bacteriana de las branquias; en tanto que, *Flavobacterium columnare*, ocasiona la enfermedad de la columna, en la cual también se incluye a la signología de la enfermedad de la montura y del pedúnculo. En su presentación sistémica, *Flavobacterium psychrophilum* ocasiona una septicemia de gran importancia económica a nivel mundial, conocida como el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS) por afectar típicamente a peces salmonídeos recién eclosionados y en etapa de cría, aunque también afecta a otras especies de peces que se encuentran en sus primeras etapas de desarrollo (Izumi y Wakabayashi, 1999; Hirsh *et al.*, 2004; Glenn y Post, 2005).

El objetivo del presente trabajo es reunir y analizar información sobre el proceso ocasionado por la infección por la bacteria Gram negativa *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), como agente etiológico de una enfermedad emergente que afecta la producción de esta especie la cual tiene gran importancia económica y social en nuestro país.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es una actividad importante para muchas zonas de México. Dependiendo de las condiciones geográficas y ambientales, así como de la disponibilidad de agua, entre otros factores, la actividad se realiza bajo distintos modos de producción; sin embargo, independientemente del sistema de producción utilizado, en los hábitats en que se desarrollan los peces existen una gran variedad de agentes infecciosos de origen viral, parasitario y bacteriano que pueden propiciar su baja productividad.

Las patologías ocasionadas por *F. psychrophilum* son de gran interés para la piscicultura mundial, sobre todo para especies salmonídeas. Dentro de estas, el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS), afecta alevines y crías de primera alimentación, que son animales muy susceptibles a la infección porque entre otros factores, tienen un sistema inmune poco desarrollado. Debido a que este tipo de animales son los que se comercializan de manera más común entre granjas que se dedican a la engorda y venta de trucha para consumo humano, se facilita la diseminación e intercambio de este agente patógeno, contaminando granjas sanas, aumentando la mortalidad y disminuyendo la rentabilidad de los cultivos; por lo que es importante reconocer y conocer las medidas necesarias para su prevención y control.

El síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS), se ha reportado en prácticamente todos los países que realizan cultivos de salmónidos, en los cuales se considera una de las enfermedades de mayor impacto económico, aun cuando no aparezca en la lista de enfermedades de peces de la OIE; según estudios de otros países esta enfermedad puede generar mortalidades que pueden ir desde el 50 al 90%.

Sin embargo, en México no se cuenta con un reporte oficial o científico sobre la existencia de *Flavobacterium psychrophilum* en truchas del país; recientemente, a principios del año 2016 en el área de diagnóstico de sanidad acuícola del

CIESA, se confirmó la presencia de RTFS en granjas de truchas del centro del país.

Debido a lo anterior, es importante reunir y difundir información específica y actualizada de dicha enfermedad y su agente causal a los productores, a los especialistas en piscicultura y a todas las personas involucradas en la actividad en distintos ámbitos, encaminado a poder identificar oportunamente la ocurrencia de la enfermedad y de conocer las estrategias rápidas y efectivas para su control, y con ello disminuir los riesgos e impactos a la salud de los peces y al sector.

OBJETIVOS

Realizar una revisión bibliográfica que permita identificar los aspectos más relevantes sobre la bacteria filamentosa *F. psychrophilum* y el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS), como enfermedad emergente para la trucha arcoíris.

Aportar información sobre los procesos originados por *F. psychrophilum* como apoyo técnico para estudiantes, productores y técnicos en acuicultura.

MATERIAL

Para la elaboración de la presente tesina se utilizó información de tipo bibliográfico obtenido de:

- Artículos científicos de revistas.
- Artículos científicos e información de Internet y base de datos, como: PubMed, Blackwell Synergy, ISI-Knowledge, CAB Abstracts y del Medline.
- Libros
- Memorias de congresos y reuniones de investigación.

Además de equipo de cómputo: computadora e impresora; USB, CD's, hojas, lápices y bolígrafos.

MÉTODO

El presente trabajo consistió en seleccionar la información científica sobre *Flavobacterium psychrophilum* y la enfermedad que provoca, el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS), a través de internet (buscadores: PubMed, Blackwell Synergy e ISI-Knowledge), y en las bases de datos (CAB Abstracts y Medline), utilizando descriptores de interés: *F. psychrophilum*, trucha arcoíris. Los conectores boléanos utilizados fueron: and, or y review.

Se identificó, selecciono, recopiló y analizó la información para ordenarla mediante la elaboración de fichas de trabajo.

Una vez recopilada la información, se organizó para presentarla de acuerdo a los capítulos que integran el trabajo:

Capítulo I: La piscicultura

Capítulo II: Generalidades sobre enfermedades bacterianas en piscicultura

Capítulo III: Procesos ocasionados por *Flavobacterium* spp en trucha arcoíris

Capítulo I. La piscicultura

La acuicultura es una actividad que se realiza en todo el mundo desde hace más de 2000 años con la finalidad de producir peces y demás especies que se pueden criar en cautiverio en agua dulce, salobre y salada (FAO, 2009 y 2012). Lo anterior engloba el manejo y manipulación de las distintas etapas de desarrollo de los organismos acuáticos, dando a los especímenes los medios adecuados para su crecimiento y engorde hasta la obtención del producto de la especie en cultivo. Por otra parte, la acuicultura es una de las mejores técnicas ideadas por el hombre para incrementar la disponibilidad de alimentos y se presenta como una nueva alternativa para la administración de los recursos acuáticos (preservación de especies) (Aguilera y Noriega, 1999; Cifuentes, 2010).

En el contexto internacional, Asia es el continente con mayor contribución a la producción acuícola mundial, sin embargo, Latinoamérica y el Caribe han experimentado el crecimiento más acelerado de esta actividad en los últimos años, con una expansión mayor al 20% anual (FAO, 2009), lo que contribuye con un 2.3% de la producción acuícola global. En América Latina la acuicultura es relativamente nueva, por lo que no existen tradiciones que permitan el desarrollo en otras regiones, pero su potencial es muy grande y con una buena planificación se podrán establecer programas importantes; los principales países que la desarrollan son Brasil, Cuba, Chile, Ecuador, El Salvador, México, Paraguay y Puerto Rico (FAO, 2009; Cifuentes, 2010).

La piscicultura como proceso enfocado al cultivo racional de peces en cautiverio ofrece grandes ventajas, como:

- La crianza de una amplia cantidad de especies de importancia económica, utilizadas como alimento o como recreación. Al lograr una producción en masa se obtienen mejores ganancias como remuneración al trabajo realizado del cultivo.

- Los peces son excelente alimento de alto valor nutricional en componentes esenciales: proteínas y minerales, tanto para el ser humano como para otras especies animales.
- Los productos obtenidos en la piscicultura se consideran de mejor calidad sanitaria que los productos obtenidos por pesca o captura; requisitos que se deben cumplir apegado a normas para la comercialización (Ortega y Valladares, 2015).
- Los peces ocupan un espacio tridimensional por lo que se pueden mantener de forma exitosa a un alto número de ejemplares en un espacio determinado.
- Los estanques se pueden construir en terrenos que no son aptos para la agricultura o la ganadería, obteniendo provecho aun así de estos mismos, siempre y cuando exista agua suficiente.
- Se puede controlar y calcular su producción de acuerdo a las necesidades, y también se pueden obtener mejoras genéticas de la especie de interés. Asimismo, en un ambiente artificial, el estanque y la vigilancia constante de un cultivo evita la acción de los depredadores y competidores, algo que no sucede con la captura en lagos y ríos (Cifuentes, 2010).
- La piscicultura contribuye a la repoblación de especies amenazadas en su hábitat natural; este proceso consiste en producir alevines y peces pequeños, y llevarlos a tallas adecuadas para repoblar los cuerpos de agua, en donde estos animales pueden mejorar los rendimientos de la pesca comercial que realizan los pescadores de la región, o bien la finalidad es que se aumenten las poblaciones de animales que se utilizan en la pesca deportiva (Aguilera y Noriega, 1999; Cifuentes, 2010).

Actualmente, las labores destinadas al cultivo de peces representan gran importancia económica y social, ya que pueden recaer en cualquiera de los siguientes aportes:

1. Proteína de origen animal de buena calidad y a bajo costo.
2. Aprovechamiento sostenido de los recursos, como terrenos o tierras no aptas para la agricultura u otra actividad que por la naturaleza del terreno no permita otra actividad diversa (como pueden ser terrenos pedregosos, de textura compacta, de pendiente pronunciada, o ya sea terrenos baldíos), ayudando a controlar la erosión.
3. Se pueden explotar recursos hídricos no aprovechados ni utilizados anteriormente; se puede alternar la piscicultura con otras actividades agropecuarias, como la ganadería y la agricultura, llamándolos cultivos integrados.
4. La producción de peces realizada de manera eficiente contamina muy poco; el agua se puede reutilizar o reciclar; ofreciendo un importante aporte al ingreso económico.
5. Algunas especies soportan aguas de baja calidad, por lo que para algunos cultivos se pueden aprovechar cuerpos de aguas estancadas o pantanosas.
6. Se pueden realizar cultivos integrados y policultivos sin requerir alimentos costosos; se utiliza únicamente el alimento que se produce naturalmente en el ambiente, en donde por sus hábitos alimentarios complementarios los peces no compiten entre sí por el alimento.
7. La actividad puede incrementar fuentes de trabajo durante todo el proceso de crianza y recolección ya sea de forma directa o indirecta (Aguilera *et al.*, 1998; Cifuentes, 2010).

A nivel mundial, las carpas (*Cyprinus* spp) son las especies mayormente producidas, seguidas por la tilapia (*Oreochromis* spp); mientras que la de clase salmónidas (incluida la trucha arcoíris) ocupan la octava posición, pero económicamente son muy importantes ya que son especies más cotizadas, destinadas principalmente a los países desarrollados. Es así, que en la sanidad piscícola, existe un mayor registro de enfermedades de salmónidos, y una mayor regulación por parte de las instancias sanitarias internacionales. De esta manera,

en relación a la trucha arcoíris, se conocen enfermedades de distinta etiología que afectan a edades o etapas determinadas, con mucho mejor conocimiento que para otras (CONAPESCA, 2008; FAO, 2012).

La trucha arcoíris

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es una especie que pertenece a la familia salmonidae, originaria de las costas del Pacífico de América del Norte. Es de fácil adaptación al cautiverio, y se encuentra ampliamente difundida en casi todo el mundo. Se caracteriza por tener el cuerpo cubierto con finas escamas y de forma fusiforme; su coloración varía de acuerdo al ambiente en el que se desarrolla, la edad, y el estado de maduración sexual, entre otros factores, por ejemplo, por la influencia del ambiente en riachuelos sombreados presentan color plomo oscuro mientras que en estanques expuestos a los rayos del sol ofrece una tonalidad (mucho más clara), verde olivo en su parte superior; luego una franja rojiza, para finalizar con el abdomen blanco; además posee un gran número de máculas negras en la piel a manera de lunares por lo que en otros lugares se le conoce también como trucha pecosa. La denominación de la trucha arcoíris se debe a la presencia de una franja de colores de diferentes tonalidades con predominio de una franja rojiza sobre la línea lateral en ambos lados del cuerpo (Aguilera *et al.*, 1998).

El hábitat natural de la trucha son los ríos, lagos y lagunas de aguas frías típico de los ríos de alta montaña; estos peces prefieren las corrientes moderadas, generalmente ocupan los tramos medios de fondos pedregosos y de moderada vegetación; aunque el grado de tolerancia a la temperatura en donde puede vivir es amplio puede subsistir a temperaturas de 25°C durante varios días, e incluso a límites inferiores cercanos a la congelación (Aguilera *et al.*, 1998).

La trucha arcoíris se introdujo a México en febrero de 1888, mediante importación de 33,000 ovas embrionadas de la estación piscícola *Baird* en McCloud River, California que se incubaron en la unidad piscícola de Chimaleapan

en el municipio de Ocoyoacac, Estado de México. Se considera que el cultivo formal de la especie comenzó en 1937 mediante la construcción del actual Centro Acuícola “*El Zarco*”, de donde se ha propagado prácticamente a todas las zonas productoras de trucha del país, y donde ha permanecido bajo distintos esquemas de cultivo (Ortega y Valladares, 2015).

El nivel de desarrollo de la actividad trutícola del país es muy variado; la producción se destina principalmente a la venta en forma local, trayendo consigo otros beneficios a los habitantes de estas comunidades (Ortega y Valladares, 2015).

Dentro de la industria acuícola nacional, en los últimos años la truticultura ha tenido una tasa anual de crecimiento de 2,39%, ocupando el lugar 19 en producción; ubicado en sexto lugar por el valor de ingresos económicos por venta de sus productos (CONAPESCA, 2008).

Capítulo II. Generalidades sobre enfermedades bacterianas en piscicultura

Dentro de los factores limitantes de la producción acuícola se encuentra la presencia de diversos microorganismos que pueden provocar enfermedad y procesos patológicos en los peces, lo cual a su vez genera importantes pérdidas tanto económicas como de producción, ocasionando mortalidades masivas en los estanques o medio de producción acuícola (Wolke, 1975; Brown, 2000).

Las enfermedades de peces pueden clasificarse de acuerdo a su origen en diferentes grupos, dentro de las cuales se encuentran las de etiología infecciosa asociadas a virus, bacterias, hongos y parásitos o enfermedades de origen nutricional, entre otras no infecciosas como: enfermedades congénitas y hereditarias, neoplasias y enfermedades de origen ambiental (Ronald, 1999; Brown, 2000).

En particular, las enfermedades bacterianas o ictiobacteriosis, a la cual pertenecen las *Flavobacterias*, las *Vibriosis*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* por mencionar algunas, generalmente actúan como agentes patógenos primarios, y sinérgicamente pueden contribuir a la muerte de los peces. Asimismo, los procesos patológicos originados por bacterias en los peces pueden causar una variedad de lesiones que pueden ser visibles a simple vista en diferentes órganos internos o externos, como el caso de la piel, aletas y branquias. Las fases de desarrollo o crecimiento de los peces también es una condición que tanto las bacterias Gram negativas o Gram positivas y algunas ácido alcohol resistentes inciden sobre la ocurrencia de alguna patología, que puede estar relacionado a su medio en el que cohabitan, estado nutricional e inmunológico (Ronald, 1999; Brown, 2000; Colquhoun y Duodu, 2011).

La mayoría de las bacterias patógenas son saprofitos del pez y de su entorno. Varios grupos bacterianos se pueden encontrar en la superficie de la piel o en el intestino de los peces, y solamente producen cuadros clínicos cuando el estado inmune del pez está comprometido por estrés o por la presencia de otro patógeno, provocándole enfermedad. La sobrepoblación de peces en estanques,

los cambios de temperatura, el manejo inadecuado de las especies de cultivo y los ataques por depredadores pueden desencadenar la aparición de enfermedades bacterianas, que resultan en factores estresantes que afectan al sistema inmunológico de los ejemplares (Ronald, 1999; Mauel *et al.*, 2007; Roberts, 2012).

Las bacterias que están presentes en el cuerpo de agua donde habitan peces generalmente crecen en medios de cultivo con un rango de pH entre 6 y 9, y en ocasiones es necesario adicionar al medio de cultivo cloruro de sodio; son aerobias y anaerobias facultativas y en ocasiones pueden crecer entre 20 y 30 °C. Por tanto, para lograr el correcto diagnóstico de una enfermedad es necesario aislar al agente causal, para posteriormente identificarlo de acuerdo a su morfología, afinidad a los colorantes y pruebas bioquímicas (Ronald, 1999; Brown, 2000; Hirsh *et al.*, 2004; Roberts, 2012).

El agua contaminada con exceso de materia orgánica, es un medio perfecto para el crecimiento de muchos tipos de bacterias. La flora bacteriana normal de los peces es el reflejo directo del tipo de bacterias presentes en el agua en que viven. No obstante, existen, algunas especies bacterianas considerados parásitos obligatorios, incapaces de sobrevivir mucho tiempo fuera del pez al que afectan regularmente (Glenn y Post, 2005; Roberts, 2012).

Los agentes bacterianos Gram negativos son la principal causa de enfermedades en los peces. Dentro de éstas, el grupo de las *Flavobacterias* provocan diversas patologías muy características y que se han hecho habituales para especies de peces salmonídeos en los que provocan desde una necrosis ulcerativa de la piel hasta una severa infección sistémica (León *et al.*, 2009).

Capítulo III. Procesos patológicos ocasionados por *Flavobacterium* spp en trucha arcoíris

Flavobacterium psychrophilum es una bacteria común de aislar durante los procesos patológicos conocidos como podredumbre de las aletas y cola, y de la enfermedad del pedúnculo en la trucha arcoíris y en otras especies de peces salmónidos considerados de agua fría. Otras especies de *Flavobacterias* pueden ser responsables de estos procesos en lugares o países de aguas templadas. Normalmente *F. psychrophilum* produce enfermedad cuando la temperatura del agua se encuentra por debajo de los 10° C y a veces se le conoce como enfermedad del invierno (Decostere *et al.*, 2002; Avendaño-Herrera, 2014).

En las patologías de manifestación externa que provoca la bacteria, suele invadir el borde de las aletas o de la cola, los cuales por el rozamiento pueden tener alguna lesión o solución de continuidad que permita al microorganismo causar lesiones más severas si es que la infección progresa y afecta la totalidad de la aleta o de la cola y el pedúnculo caudal (Ekman y Norgren, 2003; Avendaño-Herrera, 2014). Sin embargo, la presencia de *F. psychrophilum* es solamente una parte del complejo; muchos otros factores medioambientales, inmunológicos, nutricionales y asociados al sistema de producción y al manejo de los peces contribuyen a la iniciación y posterior evolución de las lesiones (Brown, 2000; Ostland *et al.*, 2006; Colquhoun y Duodu, 2011).

Flavobacterium psychrophilum se encuentra particularmente asociada a las lesiones necróticas en la piel de salmónidos, cuando la temperatura del ambiente en el que se cultiva la trucha es relativamente baja. En los Estados Unidos de América (EUA), Wolke (1975) demostró que la “Enfermedad de las aguas frías” (CWD), como se le conoce, afecta a peces jóvenes de la mayor parte de los salmónidos en cría intensiva, y en ocasiones cursa con una mortalidad aguda de hasta el 50%. La infección se establece mayormente en temperaturas que van de 4 a 12 °C, disminuyendo las pérdidas si la temperatura del agua aumenta. Muchas

veces, los estanques más afectados son aquellos que tienen mayor densidad de peces o una mayor cantidad de desechos orgánicos (Ostland *et al.*, 2006).

LaFrentz y col. (2002), y de forma similar Ekman y Norgren (2003), al comparar la patología macroscópica y microscópica en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) inyectada por vía intramuscular, subcutánea e intraperitoneal con células vivas de *F. psychrophilum* con una preparación de producto extracelular crudo a partir de un cultivo, observaron que las lesiones que se desarrollaron fueron similares y muy características de la enfermedad de agua fría, lo que sugiere que los productos extracelulares de *F. psychrophilum* juegan un papel importante en el proceso infectivo. Las lesiones macroscópicas internas incluían hemorragia sistémica generalizada del corazón, hígado, grasa visceral, intestino posterior, vejiga natatoria y en paredes corporales.

Aunque comúnmente estas bacterias se han asociado como patógenos de peces salmónidos, también pueden infectar a otras especies en las que pocas veces se asocian con enfermedad clínica (Cipriano y Holt, 2005). Los tres principales agentes etiológicos del género *Flavobacterium* spp que originan enfermedades bacterianas en peces son *Flavobacterium columnare* responsable de la enfermedad de la columna, *Flavobacterium branchiophilum* causante de la enfermedad de las branquias y *Flavobacterium psychrophilum* agente etiológico del síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS) (Izumi *et al.*, 2003; Loch, 2013).

Síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS)

El síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS) es una enfermedad bacteriana septicémica causado por *F. psychrophilum* que afecta a una amplia gama de especies de peces que habitan en aguas frías y templadas, y que produce grandes pérdidas en salmónidos jóvenes en la temporada de primavera y al inicio del verano (Loch *et al.*, 2013).

Esta patología ha recibido diferentes denominaciones: “Enfermedad del agua fría” (siglas en inglés, CWD: *Cold Water Disease*), “Enfermedad bacteriana del agua fría” (siglas en inglés, BCWD: *Bacterial Cold Water Disease*) (León *et al.*, 2009; Starliper, 2011; Valdebenito y Avendaño-Herrera, 2009), y “Enfermedad de la temperatura baja” (Cipriano y Holt, 2005). Se produce predominantemente en peces mantenidos a temperaturas menores de 16 °C, mostrando mayor patogenicidad cuando el agua de cultivo se encuentran a menos de 10 °C (Starliper, 2011). Además de la temperatura del agua como condición importante, existen otros factores ambientales desencadenantes como la irradiación solar directa a los alevines muy jóvenes, el estrés, la sobrepoblación y otros factores inherentes al pez, tales como la talla y el estado inmunológico, que pueden condicionar la aparición o desarrollo de la enfermedad (León *et al.*, 2009).

Signos clínicos

Clínicamente, el RTFS se caracteriza inicialmente por oscurecimiento corporal, anorexia, exoftalmia uni o bilateral, branquias pálidas, abultamiento abdominal (Figura 1); aunque con menor frecuencia también pueden acompañarse de lesiones externas tales como erosiones y ulceraciones en piel, necrosis de aletas y branquias. En casos de mayor severidad, se exhibe descamación completa de la aleta caudal con exposición abierta de la espina en el área del pedúnculo caudal. En peces muy jóvenes pueden observarse signos nerviosos como nado errático y movimientos de “torneo” debido a lesiones craneales y vertebrales; también se observan deformaciones espinales en peces que sobreviven a la infección (Madsen y Dalsgaard, 2001; Barnes *et al.*, 2011; Starliper, 2011).

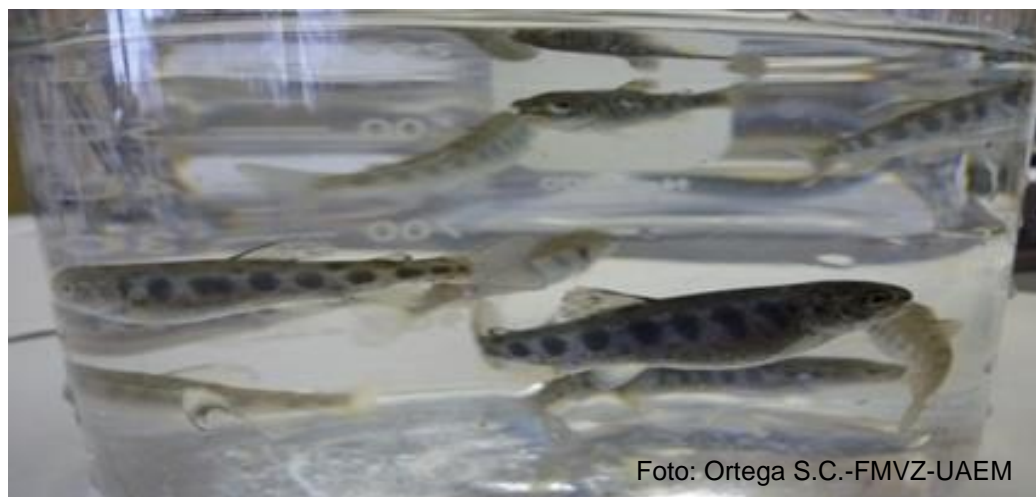


Figura 1. Crías de trucha arcoíris con RTFS. Presentan oscurecimiento corporal, distensión abdominal, exoftalmia e incoordinación.

Transmisión

Flavobacterium psychrophilum se puede transmitir vía horizontal, a través del agua que es un medio viable en donde se pueden mover las bacterias; en condiciones de laboratorio se ha demostrado que la bacteria sobrevive por largos periodos en agua dulce estéril sin necesidad de añadir ningún tipo de nutriente (Madetoja y Wiklund, 2002). Los reservorios incluyen el agua, peces muertos, peces patógeno-portadores, peces infectados y utensilios utilizados en las actividades de las granjas. Este patógeno tiene una gran capacidad para adaptarse a una variedad de entornos, en donde no sólo sobreviven, sino que también mantiene su patogenicidad (Secades *et al.*, 2003; Starliper, 2011).

Referente a la vía vertical, no se ha comprobado que ésta sea una forma efectiva para transmitir la infección, ya que la bacteria no se ha encontrado dentro de los huevos, aunque si se ha aislado de fluidos ováricos y de la superficie externa del huevo, que en general puede ser una vía de contaminación de muchos patógenos (FAO, 2009 y 2012; Vatsos *et al.*, 2006).

Hospederos

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) se consideran las especies más susceptibles a la infección (Barnes *et al.*, 2011). Peces de todas las edades de las especies mencionadas pueden verse afectadas; sin embargo, por lo general los peces más pequeños (alevines 0.2 a 2 g) son particularmente vulnerables a las infecciones, y en éstos se pueden alcanzar niveles de mortalidad de entre un 5% a 70% (Valdebenito y Avendaño-Herrera, 2009). Los brotes más graves de la enfermedad ocasionada por *F. psychrophilum* se producen en alevines que no han consumido alimento sólido (León *et al.*, 2009). Existe la posibilidad de que los peces no salmónidos desempeñen un rol de hospedero de transporte o portadores (Lonnstrom *et al.*, 2008).

Las pérdidas más severas por RTFS suelen ocurrir en peces de entre 0.2 a 2 g de peso donde puede resultar hasta en una mortalidad acumulada de 90% (Crump *et al.*, 2005), lo cual puede deberse a la inmadurez inmune de estos animales (Crump *et al.*, 2001).

Agente causal: *Flavobacterium psychrophilum*

Flavobacterium psychrophilum anteriormente conocido como *Cytophaga psychrophila* y *Flexibacter psychrophilus* (León *et al.*, 2009; Starliper, 2011), es una bacteria Gram negativa que mide 0.2 a 0.75 micras de diámetro por 1.5 a 7.5 micras de longitud (Bernardet y Kerouault, 1989), es filamentosa, psicrófila perteneciente al género Bacteroidetes (Avendaño-Herrera, 2014); produce una pigmentación amarillenta cuando crece en medios sintéticos. Fue descrita por primera ocasión por Davis en 1946, a partir de un aislamiento en trucha arcoíris. Sin embargo el microorganismo no se ha caracterizado en su totalidad y su posición taxonómica aún se encuentra bajo estudio (Holt, 1988; Ostland *et al.*, 2006).

La bacteria puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en agua de río, adoptando distintos mecanismos para sobrevivir a la falta de nutrientes. Por tanto, el estado fisiológico de la bacteria juega un rol importante para su transmisión (Vatsos *et al.*, 2006). El medio ambiente específico en donde se reproduce la bacteria aun es desconocido, aunque se supone que es en la superficie del pez o aguas que tienen un alto contenido de materia orgánica. Los depósitos naturales de *F. psychrophilum* son inciertos. La bacteria no produce microcistos y aparentemente se mantiene en estado vegetativo durante todo el año; los salmónidos “resistentes” a la infección actúan probablemente como portadores (Birkbeck *et al.*, 2011; Loch *et al.*, 2013).

Se ha observado que hasta el 67% de bacterias libres en agua de río son capaces de adherirse a la superficie de huevos no fertilizados, correlacionándose con una alta hidrofobicidad (52%), demostrando su capacidad para lograr transmisión vertical y convertirse en una fuente de diseminación de la enfermedad a partir de huevos o cuerpos de agua contaminados (Vatsos *et al.*, 2006). La adherencia de las bacterias parece depender en gran medida de la cepa bacteriana y la temperatura; es común observar abundantes estructuras bacterianas altamente patogénicas en la superficie de las branquias a temperatura de 12 °C. Existen reportes señalando diferencias en patogenicidad y virulencia de acuerdo a las cepas involucradas en la infección. Se ha demostrado correlación importante entre virulencia y capacidad de adhesión (Nematollahi *et al.*, 2003).

Flavobacterium psychrophilum puede transmitirse de salmónidos adultos sexualmente maduros a huevos y luego a alevines susceptibles. La bacteria también se ha encontrado en el mucus de la piel, tejido de riñón y de bazo, en el líquido ovárico y el semen de animales sexualmente maduros (LaFrentz *et al.*, 2002; Avendaño-Herrera, 2014).

Distribución

F. psychrophilum fue aislado por primera vez en el noroeste de Estados Unidos de América en el año de 1948, con lo cual se creía que estaba solo distribuido en el norte del continente Americano. En la actualidad se sabe que la bacteria está ampliamente diseminada a través del mundo. En trucha arcoíris se tienen reportes en Australia, Canadá, Chile, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Japón, Irlanda, Perú, Escocia, España, Suecia, Suiza, Turquía, Reino Unido y Estados Unidos de América (Bernardet y Kerouault, 1989; Valdebenito y Avendaño-Herrera, 2009; León *et al.*, 2009; Starliper, 2011); en México fue observada en la última década del siglo XX, y confirmada en 2017 (Castillo *et al.*, 2017).

Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *F. psychrophilum* incluyen adhesinas, exotoxinas, proteasas, endotoxinas que contribuyen con la patogenicidad de la bacteria. La actividad proteolítica se desarrolla a través de la acción de enzimas metaloproteasas calcio dependientes que causan daño directo sobre los tejidos o que también favorecerían la invasión de la bacteria, teniendo finalmente un rol importante en la patogenicidad (Madsen y Dalsgaard, 2001; Ramsrud *et al.*, 2007).

Existe poca información acerca de los mecanismos de virulencia de *F. psychrophilum* debido a la complejidad de sus productos metabólicos. Sin embargo, se sabe que las proteasas extracelulares podrían contribuir a la patogenicidad, ya que se ha demostrado que producen diferentes enzimas proteolíticas capaces de degradar gelatina, caseína, tirosina, elastina, fibrinógeno, colágeno y extracto de músculo que podrían causar lesiones en los tejidos o incrementar la capacidad invasiva de las cepas (Madetoja y Wiklund, 2002; Secades *et al.*, 2003).

La bacteria se ha encontrado colonizando las áreas de mayor vascularidad del cuerpo, incluyendo capilares lamelares secundarios de branquias, riñón, oído y

bazo; sin embargo, también se ha detectado en el peritoneo, vejiga natatoria, el hígado, intestino y el páncreas. La causa de muerte de los peces se ha atribuido a daños en el tejido cardíaco. Las lesiones derivadas de la infección estarán constituidas por un gran número de bacterias junto con el tejido epitelial proliferativo y el mucus que al desprenderse deja un importante déficit tisular (Vatsos *et al.*, 2006; Roberts, 2012).

La adherencia de las bacterias depende en gran medida de la cepa bacteriana que se tenga y la temperatura en la que se encuentre, es común encontrar cepas muy patógenas en temperaturas que oscilan los 12 °C (Nematollahi *et al.*, 2003).

Se ha establecido que los factores de virulencia propios de la bacteria tienen que ver con su supervivencia dentro de los macrófagos. En este sentido, se ha demostrado que muchas bacterias sobreviven al complejo fagolisosomal (donde permanecen fuera del alcance de células y proteínas del sistema inmune) en animales de menos de cinco meses de edad. Posteriormente, se pueden hallar más bacterias a nivel extracelular donde se hallan expuestas a otros mecanismos efectores del sistema inmune como las proteínas del sistema complemento (Decostere *et al.*, 2001). Algunos autores sugieren que el LPS (Lipopolisacárido: producto de la pared celular de algunas bacterias Gram negativas que actúan como mitógeno de las células B) de *F. psychrophilum* es fuertemente inmunógeno (Crump *et al.*, 2001).

Patogenicidad

Los signos clínicos de los peces afectados por el síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS) son variados y muy extensos; parte de éstos se consideran generales e inespecíficos, pero algunos pueden ser un tanto más propios o específicos. Entre los signos generales se incluye apatía, pérdida de apetito que lleva a la caquexia crónica; la erosión de las puntas de aletas suelen ser los signos iniciales (Barnes *et al.*, 2011).

Como se ha indicado, la infección provocada por *F. psychrophilum* puede derivar en dos formas de enfermedad claramente diferenciables:

1. En una de las formas, se producen lesiones abiertas muy características en las superficies externas del cuerpo de los peces, donde en casos severos son muy impactantes. Puede ocurrir una exposición total de la columna vertebral de la zona caudal (enfermedad del pedúnculo), y en otra presentación llega incluso a la desaparición total de la aleta dorsal (Cipriano y Holt, 2005; Starliper, 2011), por lo que comúnmente se le denomina como erosión tipo silla de montar o enfermedad de la montura (Figura 2). Sin embargo, estas lesiones también se pueden observar en los costados, en la región mandibular y en la musculatura, con mayor frecuencia entre la aleta dorsal y la cabeza (Cipriano y Holt, 2005).

En las zonas de colonización bacteriana pueden aparecer áreas blancas o amarillentas; movimiento lento de aletas, y algunos peces presentan separación de los radios de las aletas (Cipriano y Holt, 2005).



Foto tomada de: <https://s3.wp.wsu.edu/uploads/sites/609/2015/02/tail-lesion-450.jpg>

Figura 2. Cría de trucha arcoíris con signos de enfermedad de la montura y enfermedad del pedúnculo.

2. La otra forma de presentación es la de tipo sistémico (propriadamente el RTFS), caracterizada por el desarrollo de una septicemia que se acompaña de una amplia patología interna, en la cual se puede observar una marcada palidez general externa e interna (Figura 3 y 4). Los especímenes afectados presentan letargo, distensión abdominal, exoftalmia (a menudo bilateral),

pigmentación oscura de piel y branquias pálidas. En ocasiones se puede observar ulceración de color amarillento y perforación costal, a la altura o ubicación del bazo (Figura 4) (Starliper, 2011; Cipriano y Holt, 2005).



Figura 3. Crías de trucha arcoíris con RTFS. Palidez generalizada, ascitis, líquido en estómago, oscurecimiento corporal y exoftalmia moderada.



Figura 4. Cría de trucha arcoíris con RTFS. Palidez generalizada y hemorragia en bazo.

Internamente, se observa palidez general de órganos internos y ascitis; es característico que el bazo presente necrosis y coloración amarillenta o parda; así mismo, la pared costal a nivel del bazo puede presentar necrosis (Figura 5), ulceración o perforación total. El análisis histológico muestra extenso daño en los

tejidos del hospedero, incluyendo: necrosis focal en el bazo (Figura 6), el hígado y riñón, peritonitis; aumento de la degeneración vacuolar; eosinofilia y hemosiderina en riñón; necrosis, picnocirosis e infiltración de linfocitos en la dermis y musculatura (Figura 6) (Barnes *et al.*, 2011; Starliper, 2011).



Figura 5. Cría de trucha arcoíris con necrosis y pigmentación amarillenta del bazo.

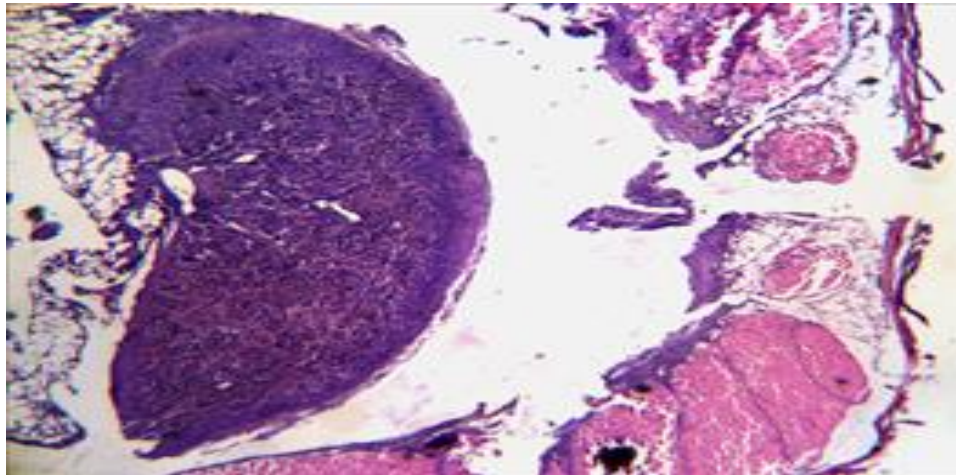


Figura 6. Corte histológico de cría de trucha arcoíris afectada con RTFS. Se observa necrosis esplénica y engrosamiento de la capsula; necrosis muscular de pared costal aledaña al bazo. 10X. H&E.

Las infecciones secundarias favorecidas por *F. psychrophilum* son muy comunes en la trucha arco iris, una de ellas es la infección por la bacteria Gram

negativa *Yersinia ruckeri*, agente causal de la enfermedad de la boca roja. Asimismo, es importante considerar que pueden existir co-infecciones con virus, por ejemplo el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (INHV), y el del síndrome de cuerpos de inclusión eritrocítica (Starliper, 2011). Incluso, la infección por IPNV debe ser considerado como probable diagnóstico diferencial.

Diagnóstico

Existen diversos métodos para llegar al diagnóstico de una infección por *F. psychrophilum* usando muestras de tejidos, raspados de úlceras y en algunas ocasiones agua contaminada. Estos incluyen estudios tan básicos como el aislamiento en los medios Tryptone Yeast Extract Salts (TYES) o Modified Anaker and Ordal Medium (MAO) que tienen como principales componentes: triptona, extracto de levadura, extracto de sodio y extracto de carne (Bernardet *et al.*, 1989; Hirsh *et al.*, 2004; Glenn y Post, 2005).

La asociación de la signología clínica y el aislamiento del agente a partir de riñón, bazo o incluso de cerebro de peces afectados representa un diagnóstico preciso de la infección. En forma adicional para la identificación del agente se pueden utilizar test de aglutinación con suero anti-*F. psychrophilum*, PCR, IFAT, ELISA, e inmunohistoquímica (Cipriano y Holt, 2005; Crump *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2011).

En el diagnóstico de laboratorio, la identificación y la caracterización de las bacterias es fundamental, partiendo de la observación de colonias convexas amarillas en agar de TYES o MAO, donde crecen filamentos Gram negativos delgados 0.5 a 0.75 x 2 a 7 μm . El crecimiento de estas bacterias es exitoso a 15 °C y no hay crecimiento a 30 °C. La identificación bioquímica se logra mediante la determinación de la presencia de pigmentos de tipo flexirubina; absorción de rojo Congo; crecimiento anaeróbico; presencia de la citocromo oxidasa y catalasa; capacidad para reducir nitratos y para producir sulfuro de hidrógeno; presencia de

β -galactosidasa; hidrólisis de la celulosa, carboximetilcelulosa, quitina, almidón, esculina y agar; hidrólisis de la gelatina, caseína y tirosina; presencia de arginina dihidrolasa y de lisina y ornitina descarboxilasas; hidrólisis de tributirina, lecitina, y Tween 20 y 80; actividad enzimática, concentración de NaCl y pH (Bernardet *et al.*, 1989; Glenn y Post, 2005). Las colonias se vuelven naranjas en presencia de KOH al 20%; son deficientes a catalasa positiva; crecimiento escaso o nulo en agar de triatoma de soya o infusión de corazón cerebro; y motilidad deslizante observada a veces con dificultad (Madetoja y Wiklund, 2002; Castillo *et al.*, 2017).

Se pueden utilizar otras pruebas más complejas como son las serológicas de aglutinación con suero de conejo anti- *F. psychrophilum* y pruebas genéticas como RAPD-PCR y en general PCR en sus distintas versiones, perfil de plásmidos, ribotipificación (Madetoja y Wiklund, 2002), hibridación sustractiva y microarreglos (Soule *et al.*, 2005a y b), todas ellas útiles para la tipificación, no así para el diagnóstico debido a su complejidad.

Histopatológicamente las lesiones son típicas de una necrosis ulcerativa lenta de la piel, que se acompañan de hiperplasia epitelial. También se ha revelado periostitis subaguda a crónica, osteítis, meningitis y ganglioneuritis. La inflamación y la proliferación periosteal de las vértebras anteriores en la unión de la columna vertebral con el cráneo fue una característica consistente de la enfermedad. Esta condición se observó en poblaciones de peces que se habían recuperado de infecciones agudas de *F. psychrophilum* (León *et al.*, 2009; Starliper, 2011). De igual manera, pueden detectarse las bacterias en cortes histológicos del corazón y riñón, especialmente cuando existe necrosis tubular (Brown, 2000; Roberts, 2012).

El diagnóstico diferencial en caso de enfermedades bacterianas debe realizarse con: furunculosis por *Aeromona salmonicida*, la enfermedad bacteriana del riñón provocada por *Renibacterium salmoninarum*, y lesiones causadas por *Aeromona hydrophila* (Starliper, 2011; Loch *et al.*, 2013); mientras que para el

caso de enfermedades virales debe diferenciarse de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) (Roberts, 2012).

Caracterización y tipificación de *F. psychrophilum*

Debido a la amplia distribución mundial de este patógeno, a lo largo de los años se han realizado diversos estudios en diferentes países donde se ha presentado de forma permanente o emergente la RTFS, algunos de los estudios sobresalientes son los realizados por Izumi y Wakabayashi (1999), donde a través de la caracterización serológica, definieron 3 serotipos mediante el uso de anticuerpos policlonales elaborados a partir de suero de conejo denominados O-1, O-2, y O-3 que corresponden a cepas de origen europeo, japonés y americano respectivamente. Por su parte, Lorenzen y Olsen (1997), identificaron tres serotipos de aislamientos europeos a los que denominaron como Fp, Fd y Th de igual forma por caracterización serológica.

Mediante la introducción de nuevas técnicas de diagnóstico Soule y col. (2005a), identificaron dos linajes genéticos claramente definidos, nombrándolos: linaje I (realizados en aislamientos de salmón) lo que resulto en una cepa de referencia genética (ATCC 49418t) y linaje II CFS 259-93 (asociado a las características propias de la trucha arcoíris) de acuerdo a los polimorfismos del gen 16S ARNribosomal. Rasmrud y col. (2007), diseñaron oligonucleótidos independientes para PCR convencional para identificar los 2 alelos propuestos por Soule y col. (2005b), teniendo una correspondencia del 100% con los resultados del estudio previo de estos últimos investigadores.

En Sudamérica no existen muchos estudios de importancia sobre la clasificación de aislados de *F. psychrophilum*; sin embargo, Chile que es el segundo productor de salmón en el mundo, aisló su primer cepa de *F. psychrophilum* en 1993, pero la genotipificación se realizó hasta 2005 ubicándola en el linaje II según Soule y col. (2005b), sin importar la especie afectada (Valdebenito y Avendaño-Herrera, 2009). Otro estudio realizado en Perú advierte

de la presencia de esta bacteria en un centro piscícola denominado “El ingenio” en 2003 que afectó a alevines de trucha arcoíris. Las bacterias fueron identificadas mediante el aislamiento y técnicas microbiológicas estándar como tinción de Gram, bioquímica y análisis de producción de enzimas extracelulares (León *et al.*, 2009).

En México la sospecha de la presencia de bacterias del tipo *Flavobacterium* se reportó en los últimos años de la década de 1990. Sin embargo, estos aislados no fueron caracterizados (Ortega *et al.*, 1998). Entre enero de 2015 y julio 2016 se obtuvieron 13 aislados sugestivos a *F. psychrophilum* que en general mostraron resultados homogéneos en cuanto a fenotipo y perfil bioquímico; los primeros estudios de laboratorio permitieron confirmar la presencia en el país de *F. psychrophilum* (Castillo *et al.*, 2017), y a la fecha no se descarta la existencia de la bacteria en otros estados de la república, pero se desconoce en qué lugares, ya que en el país, las instituciones encargadas de la salud animal no reportan la situación sanitaria de los Estados. La morfología celular de los aislados analizados es coincidente con lo reportado por la literatura, destacando la morfología de tipo filamentoso, que microscópicamente forman agrupaciones similares a una red (Bernardet y Kerouault, 1989; Holt, 1998, Lorenzen *et al.*, 1997); en general tuvieron concordancia fenotípica y bioquímica con lo reportado a nivel mundial (Izumi *et al.*, 2003; Secades *et al.*, 2003; Avendaño-Herrera, 2014).

Control y prevención

Ante la falta de vacunas eficientes contra RTFS a la fecha, la mejor forma de control de este patógeno en las granjas de peces son las terapias antimicrobianas. Aunque en el ámbito veterinario existe una amplia disponibilidad de antimicrobianos para usarse en animales terrestres, en peces estos productos están muy regulados y restringidos por instancias internacionales como la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) y la FDA (por sus siglas en inglés: *Food and Drug Administration*: Administración de Medicamentos y Alimentos).

Esta última institución, únicamente autoriza el uso de oxitetraciclina, florfenicol y Sulfonamidas como antibióticos para piscicultura. Basado en lo anterior, estos han sido los principales tratamientos contra Flavobacterias, aunque se han utilizado otros productos. Al evaluar la sensibilidad del florfenicol, oxitetraciclina, enrofloxacin y flumequina contra *Flavobacterium* spp. Riofrío (2003), observó una sensibilidad de 79.8, 79.5, 69.2 y 63 %, respectivamente. Más recientemente, Avendaño-Herrera, (2014) describe la utilización de cloranfenicol y oxitetraciclinas; mientras que Holt., (1998) menciona la utilización de oxitetraciclina, florfenicol y amoxicilina.

Pese a que no es antibiótico, el peróxido de hidrogeno (35% Perox-Aid ®) se ha utilizado en el control de enfermedades externas como en el caso de la enfermedad branquial, del pedúnculo o de la montura en salmónidos, a una dosis de 100 mg/L por 30 min o 50 a 100 mg/L por 60 min una vez al día; pueden realizarse tres tratamientos aplicados en días alternados. Este tratamiento tiene la ventaja de que no requiere periodo de retiro (Cabello, 2006).

Otro producto utilizado para el control de la mortalidad por enfermedad branquial asociado a *Flavobacterium* spp es la cloramina T (Halamid® Aqua Western Chemical, Inc. 1-800-283-5292), a razón de 12 a 20 mg/L por 60 min diario, y durante tres días o en tratamiento en días alternados. No se requiere de periodo de retiro (FDA, 2010). Lonnstrom y col. (2008), indican que la aplicación de cloramina T o formalina es un método eficiente para controlar las bacterias presentes en la superficie de los huevos e incluso pueden ayudar a mejorar las condiciones de los peces con lesiones epiteliales visibles.

El florfenicol (AQUAFLO®) es un producto utilizado también para el control de la mortalidad por RTFS asociado con *Flavobacterium psychrophilum*. Se utiliza una dosis de 10 a 15 mg florfenicol/kg de peces por día durante 10 días consecutivos y se requiere un periodo de retiro de la droga de 15 días (Cabello, 2006).

La oxitetraciclina (oxitetraciclina dihidratada - OTC) (TERRAMYCIN® 200 para peces) está recomendada en salmónidos cultivados en agua dulce para controlar la mortalidad causada por *F. psychrophilum* y *F. columnare* utilizada a dosis de 3.75 g de OTC/100 lb de peces por día durante 10 días, con 21 días de retiro (Hernández, 2005).

La sulfadimethoxine & ormetoprim (ROMET® 30) es un antibiótico que no está específicamente recomendado para infecciones por *Flavobacterium* spp, aunque se ha usado como última alternativa. En especies salmónidas se usa sobre todo para control de furunculosis causada por *Aeromonas Salmonicida*, en mezcla de alimento a dosis de 50 mg/kg de peces al día por 5 días consecutivos, y se requieren 42 días de retiro (FDA, 2010).

El uso indiscriminado de antibióticos puede ser desfavorable por el alto costo y el daño potencial e impacto a la salud humana y al medio; en los últimos años se ha observado un patrón atípico de resistencia contra los antimicrobianos en varias de las cepas de *F. psychrophilum* (Crump *et al.*, 2001), por lo que se deduce que la resistencia dependerá de la cepa que se presente en cada lugar geográfico, por ello la importancia de la tipificación (Izumi y Wakabayashi, 1999).

De acuerdo a lo anterior, es fundamental la prevención de los brotes de la enfermedad. Un tratamiento profiláctico efectivo, sería el favorecer condiciones ambientales óptimas; evitando sobrepoblación, minimizando situaciones de estrés, optimizando la calidad del agua, higiene y manejo en general durante todo el proceso productivo. Las mejores recomendaciones es la aplicación de buenas prácticas de producción piscícola, evitando la acumulación de materia orgánica en los estanques de alevines y peces de primera alimentación. Se debe de exigir la compra e introducción de peces clínicamente sanos y en la medida de lo posible conocer el historial sanitario de los lugares de donde se introducen peces. Realizar la desinfección de huevos importados o nacionales introducidos a la granja. Contar con un servicio de diagnóstico oportuno ante la ocurrencia de cualquier caso de

anormalidad que haga sospechar de la presencia de la enfermedad y realizar acciones de control y tratamiento rápidos (LGPAS, 2007; OIE, 2012).

Actualmente, no existen vacunas comerciales contra *F. psychrophilum* (Ramsrud *et al.*, 2007). Con la idea de prevención se han empleado bacterinas inactivadas con formalina o calor, inyectadas con adyuvante oleoso que parecen disminuir la mortalidad asociada a la infección experimental (Madetoja y Wiklund, 2002). Sin embargo, los resultados han sido poco satisfactorios debido al lento y fastidioso crecimiento de la bacteria, que han impedido su producción o mayor evaluación. Debido a lo anterior, las vacunas subunitarias recombinantes contra *F. psychrophilum* se encuentran en evaluación para varios antígenos de superficie como el FspA (antígeno proteico específico de *Flavobacterium*) (Crump *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Flavobacterium psychrophilum es un patógeno de gran relevancia en el cultivo de especies salmonídeas, especialmente la trucha arcoíris debido a la alta mortalidad que manifiesta afectando de manera importante la rentabilidad de los cultivos.

El síndrome del alevín de la trucha arcoíris (RTFS) tiene una distribución mundial y en México fue recientemente confirmada, y el agente etiológico caracterizado.

Aunque se reporta existen antibióticos que pueden ser usados durante la ocurrencia de esta enfermedad, los tratamientos no siempre ofrecen los resultados esperados, por lo que se recomienda realizar buenas prácticas de producción y mejorar medidas de bioseguridad para evitar la ocurrencia de la enfermedad.

SUGERENCIAS

En el caso de México, la enfermedad solo se ha informado en los estados de México y Michoacán, sin embargo, tomando en cuenta que las crías de trucha arcoíris son ampliamente comercializadas a partir de pocas granjas reproductoras en donde se ha detectado la enfermedad, es posible que RTFS exista en otros Estados; por lo que es recomendable realizar un estudio más amplio sobre la situación de esta enfermedad en la República Mexicana.

LÍMITE DE ESPACIO

El trabajo se realizó en las salas de estudio y bancos de información (base de datos), de los siguientes centros:

Biblioteca Central del Cerrillo Piedras Blancas, de la Unidad *Campus* el Cerrillo de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Instituto Nacional de Investigación y Fomento Agropecuario (INIFAP) de Palo Alto. Ciudad de México.

Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

LÍMITE DE TIEMPO

El trabajo se realizó en el período comprendido de noviembre de 2016 a abril de 2017; para la elaboración del documento se incluyó la información más relevante en donde destacaron las fases de búsqueda y recolección de información, análisis y elaboración de fichas bibliográficas, y redacción del documento.

Cronograma de actividades

Actividad	Nov-Dic 2016	Enero 2017	Febrero 2017	Marzo-Abril 2017	Mayo-Julio 2017
Búsqueda y recolección de información	X	X			
Análisis y elaboración de fichas bibliográficas	X	X			
Redacción de protocolo	X	X	X		
Redacción del documento final			X	X	X

LITERATURA REVISADA

- Aguilera, H.P.; Noriega, C.P.; Guzmán, J.Ch. (1998). La trucha y su cultivo. Fondapesca.
- Aguilera, P. y Noriega, P. (1999). ¿Qué es la acuicultura?. Fondepesca. Secretaría de Pesca. México. pp. 67-73.
- Avendaño-Herrera, R. (2014). Introduction, expansion and coexistencia of epidemic *Flavobacterium psychrophilum* lineages in Chilean Fish Farms. *Veterinary Microbiology*, 170:298-306.
- Barnes, M.; Michael, L.; Brown, L. (2011). A Review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. *The Open Fish Science J.*, 4:1-9.
- Bernardet, G. y Kerouault, M. (1989). Phenotypic and Genomic Studies of "Cytophaga psychrophila" Isolated from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(7):1796-1800.
- Birkbeck, T.H.; Feist, S.W.; Verner-Jeffreys, D.W. (2011). *Francisella* infections in fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases*. 34(3):173-187.
- Brown, L. (2000). Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. Acribia, España.
- Cabello, F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8:1137-1144
- Castillo, A.Y.; Ortega, C.; Fajardo R.; Martinez-Castañeda, S.; Valladares, B.; Irgang, R.; Poblete-Morales, M.; Avendaño-Herrera, R. (2017). First isolation and characterization of *Flavobacterium psychrophilum* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Mexico. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 37(1): 23-30.
- Cifuentes, L.J.L. (2010). Manual Básico de Piscicultura en Estanques. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Uruguay.

<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/090/html/ocano11.html> (09 Mayo 2017).

- Cipriano, R.C. y Holt, R.A. (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet No. 86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV.
- Colquhoun, D.J. y Duodu, S. (2011). *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research*. 42:47.
- CONAPESCA (2007) “Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2007”. Mazatlán, Sin, México.
- CONAPESCA (2008) “Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2008”. Mazatlán, Sin, México.
- Crump, E.; Malcolm, M.; Perry, B.; Sharon, C.C.; William, W.K. (2001). Antigenic Characterization of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2):750-759.
- Crump, E.; Burian, J.; Allen, P.D.; Kay, W.W. (2005). Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology*, 151: 3127–3135.
- Decostere, A.; Haese, E.D.; Lammens, M.; Nelis, H.; Haesebrouck, F. (2001). *In vivo* study of phagocytosis, intracellular survival and multiplication of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), spleen phagocytes. *J. of Fish Diseases*, 24: 481- 487.
- Ekman, E. y Norgren, L. (2003). Pathology and immunohistochemistry in three species of salmonids after experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *J. of Fish Diseases*. 26:529-538.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2009) “El estado Mundial de la Pesca y La Acuicultura”. Roma, FAO Editores. pp. 176.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2012) "El estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación". Roma, FAO Editores. pp. 162.
- FDA (US: Administración de Medicamentos y Alimentos)(2010). Extralabel use of approved drugs in aquaculture. In Program policy and procedures manual guide 1240.4210. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/PoliciesProceduresManual/ucm046932.pdf>. (13 Julio 2017).
- Glenn, J.S. y Post, K.W. (2005). Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Diseases. Elsevier Saunders. USA. pp. 209-213.
- Hernández, S.P. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 469. Rome, FAO.
- Hirsh, D.C.; James, N.M.; Walker, R.L. (2004) Veterinary Microbiology. 2ª ed. Blackwell Publishing. USA. pp. 117-124.
- Holt, R.A. (1998). *Cytophaga psychrophilum*, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. Tesis Doctor, Oregon State University, Corvallis.U.S.A.
- Izumi, S.; Aranishi, F.; Wakabayashi, H. (2003). Using PCR-RFLP analysis. Dis. Aquat Organ., 56: 207-214.
- Izumi, S.; Wakabayashi, H. (1999). Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. Fish Pathology, 34:89-90.
- LaFrentz, B.R.; LaPatra, S.E.; Jones, G.R.; Congleton, J.L.; Sun, B.; Cain, K.D. (2002). Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative percent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. J. of Fish Diseases, 25:703-713.

- León, J.; Ávalos, R.; Ponce, M. (2009). *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. Rev. Peru. Biol., 15(2): 117-124.
- LGPAS (Ley General de Pesca y Acuicultura sustentable). (2007). México <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGPAS.pdf/>. (10 Enero 2017).
- Loch, T.P.; Fujimoto, M.; Woodiga, S.A.; Walker, E.D.; Marsh, T.L.; Faisal, M. (2013). Diversity of Fish Associated Flavobacteria of Michigan. J. of Aquatic Animal Health, 25:149-164.
- Lonnstrom, L.G.; Hoffrn, M.L.; Wiklund, T. (2008). *Flavobacterium psychrophilum* associated with mortality of farmed perch *Perca fluviatilis* L. J. of Fish Diseases, 31:793-797.
- Lorenzen, E. y Olensen, N.J. (1997). Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. Diseases of Aquatic Organisms, 31:209-220.
- Madetoja, J. y Wiklund, T. (2002). Detection of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in Water from Fish Farms. System. Appl. Microbiol., 25:259-266.
- Madsen, L. y Dalsgaard, I. (2001). Comparative studies of Danish *Flavobacterium psychrophilum* isolates: ribotypes, plasmid profiles, serotypes and virulence. J. of Fish Diseases 23:211-218.
- Mauel, M.J.; Soto, E.; Morales, J.A.; Hawke, J. (2007). A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. J. of Aquatic Animal Health 19:27–34.
- Nematollahi, A.; Decostere, A.; Pasmans, F.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. (2003). Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Organ., 55: 101-107.

- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2012). Código sanitario para los animales acuáticos. 16ª ed. OIE, Paris. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/código-acuático> (14 Diciembre 2016).
- Ortega S.C. y Valladares C.B. (2015). La piscicultura como alternativa alimentaria para México. Análisis de la situación actual y acciones para impulsar la actividad en el país. En: Loredó-Padilla S. (editor): La crisis alimentaria y la salud en México. Castellanos editores, S.A. de C.V. México, D.F.
- Ortega, C.; Salgado, C.; Vega, F.; Romero, V. (1998). Descripción de un cuadro clínico de enfermedad branquial en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), causado por *Flexibacter* sp. Proceedings: Programa Nacional de Sanidad Acuicola. pp. 50.
- Ostland, V.E.; Stannard, J.A.; Creek, J.J.; Hedrick, R.P.; Ferguson, H.W.; Carlberg, J.M.; Westerman, M.E. (2006). Aquatic *Francisellalike* bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* 3 *M. saxatilis*. Diseases of Aquatic Organisms 72:135–145.
- Ramsrud, A.L.; LaFrentz, S.A.; LaFrentz, B.R.; Cain, K.D.; Call, D.R. (2007). Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. J. of Fish Diseases, 30: 175-180.
- Riofrío, P. (2003). Caracterización microbiológica, bioquímica y serológica de aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum* y sensibilidad a antimicrobianos. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Roberts, R. (2012) Fish Pathology. 4ª ed. Wiley-Blackwell, Oxford UK. pp. 346-348
- Ronald, R.J. (1999). Patología de los Peces. Mundo prensa - Edición española. pp. 209-215.
- Secades, P.; Álvarez, B.; Guijarro, J.A. (2003). Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Fems Microbiology Letters 226 (2):273-279.

- Soule, M.; Cain, K.; LaFrentz, S.; Call, D. (2005a). Combining suppression subtractive hybridization and microarrays to map the intraspecies phylogeny of *Flavobacterium psychrophilum*. *Infection and Immunity*, 73:3799-3802.
- Soule, M.; LaFrentz, S.; Cain, K.; LaPatra, S.; Call, D. (2005b). Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* with elastin and tetracycline resistance. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65:209-216.
- Starliper, C.E. (2011). Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *J. of Advanced Research*. 2: 97-108.
- Valdebenito, S. y Avendaño-Herrera, R. (2009). Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *J. of Fish Diseases*, 32: 321-333.
- Vatsos, I.N.; Thompson, K.D.; Adams, A. (2006). Colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), eggs by *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of rainbow trout fry syndrome. *J. of Fish Diseases*, 29:441-444.
- Wolke, R.E. (1975). Pathology of bacteria and fungi disease affecting fish. In: *The Pathology of Fishes*. Ribelin, W.E. y Nigaki F. University of Wisconsin Press. Wisconsin. U.S.A. 33-116.