



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES, IZTACALA

400282



61060

"Respuesta de anticuerpos específicos contra *Saprolegnia*
spp en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)"

B01147/95
E₁.3

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A :
MARIA TERESA VEGA RAMIREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Celular I, del Departamento de Inmunología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional; en colaboración con el Centro Acuícola "El Zarco"; la Dirección General de Acuicultura; la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México; bajo la dirección del M en C. Rubén López Santiago.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Rubén López Santiago por ser un ejemplo de disciplina y constancia, gracias por creer en este proyecto y ayudarme a comprender que siempre podemos realizar lo que queremos.

A la M. en C. Martha Cecilia Moreno Lafont por todo tu apoyo a lo largo de esta aventura, mil gracias por todas las aportaciones (incluida la revisión) a este trabajo.

Al Biol. Luis Contreras, porque sin su ayuda jamás hubiéramos cristalizado este trabajo.

A los Biólogos Juan Antonio Pérez y Alejandra Guerra, y a todo el personal del C. A. "El Zarco" que me brindaron todo su apoyo durante las jornadas de muestreo.

Al M. en C. Juan Manuel Adame, al Dr. Roberto Cervantes y a la MVZ Ma. del Carmen Aldana Medina por la ayuda prestada en la identificación de las cepas aisladas del Centro Acuícola. "El Zarco".

Al Dr. Humberto Lanz, donde quiera que te encuentres, mil gracias.

Al todo el personal del Departamento de Inmunología de la ENCB, IPN.

Al M. en C. Angel Durán y al M. en C. Agustín Vargas, mis queridos profesores de la UNAM, Campus Iztacala.

A Tere y Emilio, por ser lo más valioso en mi vida y mis amigos incondicionales.

A Salim, gracias porque sin tu ayuda no hubiera seguido adelante.

A todas aquellas personas que creyeron en este trabajo, *mil gracias!*

INDICE

	Página
Introducción	1
Antecedentes	3
A. Sanidad Animal	3
B. Sanidad Piscícola	3
1. Micología de los teleósteos	8
a. Micosis tegumentarias. Saprolegniasis	8
C. Sistema inmunológico en peces	16
1. Inmunidad de secreciones	17
2. Factores que afectan la respuesta inmune en peces	21
a. Temperatura	21
b. Factores conductuales	21
3. Inmunoglobulinas en pez: estructura y función	22
4. Respuesta inmune hacia infecciones	24
Objetivos	25
Cuadro de flujo	26
Material y métodos	27
Resultados	36
Discusión	59
Conclusiones	68
Referencias bibliográficas	70

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Lecturas de D.O. de las pruebas de ELISA practicadas a sueros de organismos sin lesiones cutáneas aparentes.	38
Tabla II. Lecturas de D.O. de las pruebas de ELISA practicadas a sueros de organismos con lesiones cutáneas.	40
Tabla III. Lecturas de D.O. de las pruebas de ELISA practicadas a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando el antígeno de la cepa I de <i>Saprolegnia</i> sp.	44
Tabla IV. Lecturas de D.O. de las pruebas de ELISA practicadas a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando el antígeno de la cepa II de <i>Saprolegnia</i> sp.	46
Tabla V. Lecturas de D.O. de las pruebas de ELISA practicadas a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando el antígeno de la cepa III de <i>Saprolegnia</i> sp.	48
Tabla VI. Lecturas de D.O. de las pruebas de ELISA practicadas a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando el antígeno de la cepa III de <i>Saprolegnia</i> sp.	50
Tabla VII. Pesos moleculares (expresados en KDa) obtenidos para las diferentes cepas aisladas de organismos con infecciones cutáneas.	54
Tabla VIII. Pesos moleculares (expresados en KDa) de las proteínas reconocidas por organismos con lesiones moderadas y con lesiones severas para las cepas I y II de <i>Saprolegnia</i> spp.	56

LISTA DE FIGURAS:

	Página
Figura 1: Género de <i>Saprolegnia</i> .	10
Figura 2: Ciclo de reproducción asexual de <i>Saprolegnia</i> .	11
Figura 3: Ciclo de reproducción sexual de <i>Saprolegnia</i> .	12
Figura 4: Mapa de localización del Centro Acuícola "El Zarco".	29
Figura 5: Sistema circulatorio en trucha arcoiris.	30
Figura 6: Método indirecto de ELISA.	31
Figura 7: Porcentaje de organismos positivos para las diferentes cepas aisladas de organismos con infecciones cutáneas.	43
Figura 8: Respuesta de anticuerpos de sueros hacia antígenos de la Cepa I de <i>Saprolegnia</i> sp.	45
Figura 9: Respuesta de anticuerpos de sueros hacia antígenos de la Cepa II de <i>Saprolegnia</i> sp.	47
Figura 10: Respuesta de anticuerpos de sueros hacia antígenos de la Cepa III de <i>Saprolegnia</i> sp.	49
Figura 11: Respuesta de anticuerpos de sueros hacia antígenos de la Cepa IV de <i>Saprolegnia</i> sp y <i>Mucor</i> sp.	51
Figura 12: Electroforesis en geles de poliacrilamida.	53
Figura 13: Análisis por <i>Western blot</i> .	57

INTRODUCCION

B. Los peces son animales poiquilotermos, por lo que su sistema inmunológico es altamente dependiente de los cambios existentes en la temperatura ambiental.

C. Al conocer la anatomía y función del sistema inmunológico de los peces, como ha ocurrido en organismos de otros *phyla*, podemos actuar en una forma más directa y específica en la profilaxis y terapia contra enfermedades que se presentan en cultivos o en acuarios.

D. Los peces son organismos accesibles para el estudio de laboratorio, en campos tan importantes como la ontogenia y filogenia, que se efectúan en peces ovíparos, ya que la existencia de fases larvarias facilitan este trabajo (38).

El conocimiento de la anatomía del sistema inmunológico de los peces ha llevado a la descripción de órganos linfoides, y su participación en la producción de anticuerpos. Los estudios realizados sobre el fenómeno de fagocitosis y la activación del complemento demuestran que son esencialmente parecidos a los descritos en mamíferos. Existe también información acerca de la existencia de células linfoides similares a las poblaciones T y B de los mamíferos. Aparentemente la respuesta de anticuerpos y de células involucra una serie compleja de interacciones, con la implicación de factores hormonales llamados interleucinas.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

A. SANIDAD ANIMAL

En todas las épocas, el bienestar y la existencia misma del género humano ha dependido en gran medida de animales domésticos y de especies que le brindan alimento, vestido, medio de trabajo, de transporte y de distracción. Esto explica la importancia que reviste el estudio de las diversas enfermedades que aquejan a los animales y la gran trascendencia económica y social que tienen.

La salud animal es, asimismo, un tema de gran relevancia por su estrecha vinculación con la salud humana, debido a su importancia en la producción de alimentos, y a que es un elemento crítico en la prevención, control y erradicación de las zoonosis.

Uno de los factores que limitan el desarrollo socio-económico de un país es la cuantiosa pérdida económica causada por las enfermedades de los animales. La salud animal constituye uno de los factores básicos en los programas de desarrollo pecuario (30). La sanidad es una necesidad práctica de servicios debidamente ordenados para la aplicación de todas aquellas medidas que preservan la salud de los organismos a través de actividades sanitarias adecuadas.

B. SANIDAD PISCICOLA

La sanidad piscícola atiende a todas las enfermedades de origen infeccioso, ocasionadas por virus, protozoarios, bacterias, hongos, helmintos y artrópodos, y las enfermedades no

infecciosas, genéticas, nutricionales o funcionales. Su objetivo central es mantener y mejorar la salud de los peces para lograr el óptimo desarrollo y capacidad reproductiva en el tiempo mínimo recomendable para cada especie. Sin embargo, el hecho de no haber erradicado aún las diversas enfermedades, limita en forma muy importante los niveles de producción. En ocasiones, los organismos se mantienen sin signos aparentes o sin daños visibles. Eventualmente, la enfermedad desemboca en una forma crónica, con lo que se afecta severamente la producción a nivel del individuo y, en el caso de procesos infecciosos, de toda la colonia.

Varias organizaciones internacionales, como la International Office of Epizootics (OIE), la European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC) y la Food and Agricultural Organization (FAO), se han dedicado activamente al estudio de los problemas ictiopatológicos determinados por la transferencia internacional de peces vivos y huevos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha interesado por los problemas sanitarios relacionados con las enfermedades de los peces. En un reciente estudio de las leyes y reglamentaciones en este campo, se encontró que aunque la mayoría de los países controlan de una u otra forma los embarques, lo hacen en general con muy diversos grados de eficacia (48).

La FAO convocó en 1974 una Consulta Gubernamental sobre un *Convenio Internacional para Combatir la Difusión de las Principales Enfermedades Transmisibles de los Peces*. La mayoría de los delegados que asistieron a la Consulta reconocieron la necesidad de dicho Convenio, y en 1976 se celebró en París una consulta jurídico-técnica patrocinada conjuntamente por la FAO y la OIE (15).

En el año de 1987 se implementó el programa **FAO/AQUILA** que representó una excelente opción para el desarrollo de programas encaminados a presentar alternativas para el

estudio y prevención de enfermedades en peces, y desarrolló las actividades de su primera fase durante 18 meses, hasta diciembre de 1989, involucrando a 19 países de América Latina y el Caribe.

La segunda fase del proyecto (**AQUILA II**), entró en actividades a principio de 1992 con la participación de 32 países (además de los 19 que ya participaron en la primera fase, 9 naciones insulares anglofonas del Caribe, más Belice, Haití, Surinam y Guyana). AQUILA II ha involucrado hasta hoy a más de 45 instituciones nacionales, con la contribución profesional de 40 expertos provenientes de la Región (17).

En la reunión técnica de planificación en Acuicultura, celebrado en Caracas, Venezuela, en 1989, se plantearon algunos puntos en relación a la existencia de fallas en la identificación de índole patológico, así como las deficiencias de infraestructura y personal especializado, que limita el desarrollo de la acuicultura (44).

La epizootiología en animales acuáticos, particularmente peces, se hizo evidente a fines del siglo XIX, pero no fue sino hasta la mitad de este siglo en que comenzó a cobrar importancia, por lo que ha recibido atención de diversas instituciones de investigación y de administración pública que se encargan de defender la sanidad de los animales.

La epizootiología puede definirse como el aspecto veterinario de la Ecología, ya que en esencia se encarga del estudio de las relaciones entre las poblaciones de organismos hospederos y los agentes potencialmente patógenos que forman la comunidad biótica y el ambiente en el cual viven e interaccionan, y con el que a su vez forman el ecosistema. Existe a su vez un factor muy importante que tiene influencia variable sobre el curso de la enfermedad: el tiempo.

Las consecuencias inmediatas de las relaciones agente patógeno-hospedero-ambiente, es el estado de salud-enfermedad. Mientras la salud representa un estado de equilibrio dinámico entre el organismo y el medio, la enfermedad es la expresión de cualquier desequilibrio dinámico ecológico que se desarrolla cuando, dentro de un ecosistema, predominan los factores que favorecen a una infección; sin embargo, la aparición de la enfermedad está supeditada a numerosos factores secundarios extrínsecos e intrínsecos.

Los factores extrínsecos que inciden en la manifestación de las enfermedades son de tipo ambiental y se refieren principalmente al tipo de instalaciones, a la alimentación y a las características de calidad del agua.

El mecanismo por el cual un agente patógeno es transportado de su fuente al hospedero receptivo, constituye el modo de transmisión de la enfermedad. Esta transmisión puede deberse a un contagio (transporte del agente patógeno del animal hospedero al animal receptor), directo o indirecto.

Contagio directo, implica un contacto físico con el animal infectado.

Contagio indirecto actúa por diversas vías:

1. Vectores: son animales vertebrados o invertebrados que transportan el agente patógeno.
2. Vehículos: son diversos elementos que transportan un agente patógeno de un hospedero o de un reservorio, al animal receptor. Algunos de éstos vehículos pueden ser la materia orgánica, el alimento, el agua, utensilios diversos, las manos, esputo y excrementos.

La propagación de la infección está en relación con la densidad de la población animal en un área determinada: a mayor concentración de animales receptores, mayor es la

probabilidad de contagio.

Los factores intrínsecos que intervienen para crear resistencia en los hospedero es contra la infección causada por patógenos, comprenden a las primeras barreras físicas y mecánicas de protección, que están constituidas por la piel, el moco cutáneo, las escamas y las secreciones digestivas, principalmente. La segunda defensa natural está constituida por un complejo de interacciones celulares y humorales conocidas como inmunidad, que confieren resistencia específica contra la acción de un determinado agente patógeno (35).

La forma en que se manifiesta un proceso infeccioso depende de varios factores: la susceptibilidad individual dentro de una especie determinada, la patogenicidad y virulencia del agente infeccioso, factores intrínsecos del medio (temperatura y calidad del agua), y el *stress* originado por la manipulación de los animales.

Desafortunadamente la incidencia de algunas infecciones se mantiene en forma endémica en algunos centros de producción piscícola. El caso particular del Centro Acuícola "El Zarco" demuestra claramente la incidencia de algunas micosis que aparentemente no han sido controladas y mantiene latente un foco de infección para la especie que ahí se cría, la trucha arcoiris. Este problema se traduce directamente en pérdidas anuales de números importantes de organismos.

Los problemas existentes sobre sanidad piscícola parecen agravarse aún más dentro de los centros acuícolas por varias razones:

1. Manejo inadecuado de los animales
2. El transporte de crías y animales reproductores de una entidad federativa, causando transfaunación de microorganismos patógenos

3. La introducción clandestina de peces infectados, provenientes de países o zonas endémicas
4. La adopción de peces silvestres como sementales, sin estudios de sanidad.

La trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) es un pez teleósteo de agua dulce, característico de regiones boscosas altas donde la temperatura oscila entre 10 y 18°C. Generalmente se les encuentra en ríos de agua corriente y de poca profundidad. Debido a que la zona en que se encuentra ubicado el Centro Acuícola "El Zarco" cuenta con los requerimientos ambientales necesarios para el mantenimiento de la trucha arcoiris, fue destinado para la producción de dicha especie; sin embargo, la alta prevalencia de enfermedades micóticas crea una constante pérdida de organismos.

1. Micología de los teleósteos

a. Micosis Tegumentarias. Saprolegniasis

Las enfermedades fúngicas más importantes que se presentan en los peces teleósteos son aquellas micosis tegumentarias que provocan los hongos del orden *Saprolegniales*. El término se utiliza para describir las infecciones micóticas de la piel y las branquias, que pueden ser imputables a un gran número de especies de hongos.

El término moho acuático, aunque es aplicable a muchos otros grupos de hongos, se utiliza comunmente para designar a los hongos del orden *Saprolegniales*, pues se encuentran abundantemente en las aguas claras y se aíslan con facilidad, aunque muchas especies son habitantes del suelo. La mayoría de las especies de este orden son saprófitos y representan poca importancia económica directa. Sin embargo, algunas especies del género *Saprolegnia* so93n causantes de enfermedades en los peces y pueden causar daños importantes a los

viveros o en las piscifactorías (5).

A finales del siglo XIX, se despertó un gran interés por la evolución de la epizootia del salmón del Atlántico que sufría una invasión fúngica (citado en 40). A este hongo se le dió el nombre de *Saprolegnia ferax*, y se le consideró responsable de la enfermedad. Actualmente se cree que este tipo de estudios analizaban realmente las fases finales de la enfermedad conocida como necrosis ulcerativa dérmica (UDN, por sus siglas en inglés), causada por un bacilo gram-negativo denominado *Haemophilus piscium*.

En 1923 se publicó una monografía que describe a la familia *Saprolegniaceae* con gran detalle; este estudio sirvió para la clasificación de los géneros gracias a la diferenciación de las estructuras reproductivas asexuales, mientras que la definición de las especies se basó en la reproducción sexual. No fue sino hasta 1932, que se describió la forma sexual de *S. parasitica* en un medio de cultivo a base de semilla de cáñamo, utilizada como sustrato de un primer cultivo sobre huevos de peces (citado en 40). En 1970 se publicó un estudio exhaustivo del género *Saprolegnia* (citado en 40). (Fig. 1)

Los saprolegniáceos pertenecen a la clase *Oomycetes*; poseen un micelio aseptado, abundantemente ramificado. Sus estructuras reproductivas están separadas de las hifas somáticas por septos, y la reproducción asexual se realiza por medio de zoosporas biflageladas (Fig. 2 y 3).

La mayoría de las especies de este orden son saprófitos y son de poca importancia económica directa. No obstante, algunas son parásitos importantes, como *Saprolegnia parasitica*, que infecta a los peces y a los huevos de los peces. Existen algunas otras especies como *Achlya hoferi* y *Dyctyuchus* sp que son conocidos también como agentes causales de saprolegniasis. *Saprolegnia* está considerado como un patógeno oportunista

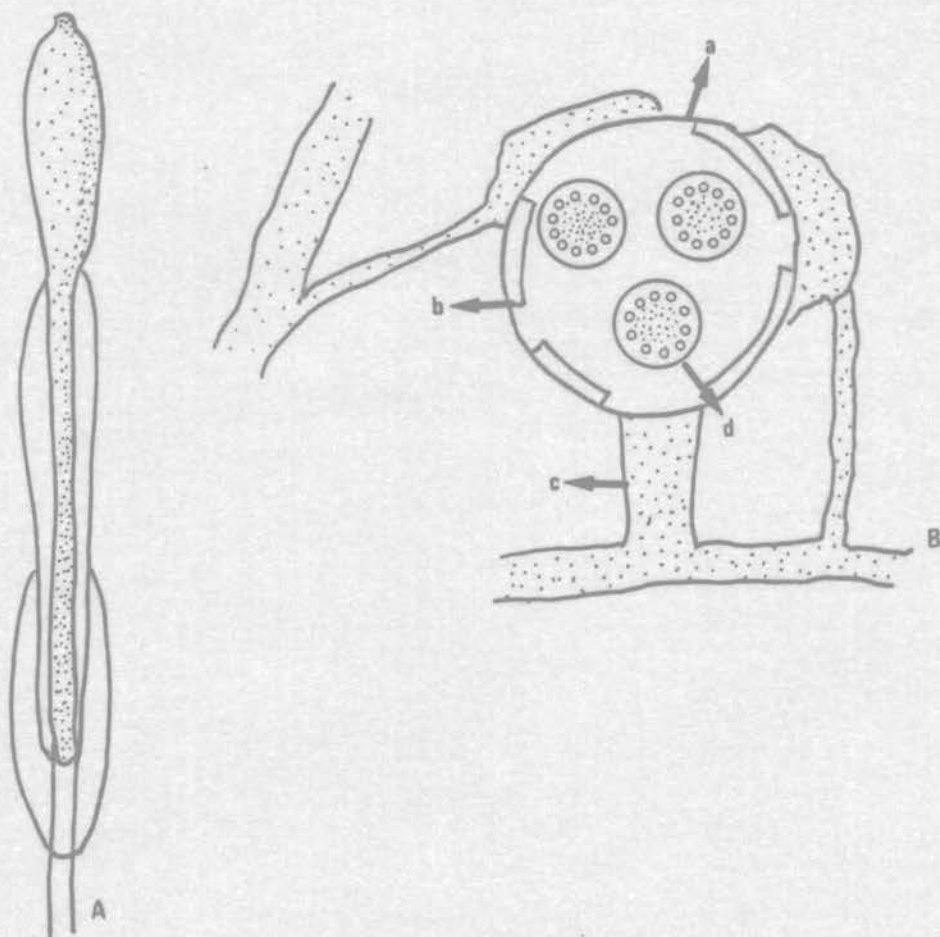


Fig 1. Género *Saprolegnia*. A. Esporangio del Género *Saprolegnia*. B. Oogonio de *Saprolegnia*. a. Pared del oogonio, b. Prominencia de la pared, c. Tallo que soporta al oogonio, d. Oospora céntrica. (Tomado de Noland-Tintiger, N. Etude expérimentale sur l'épidémiologie et la pathogénie de la saprolegniose chez *Lebistes reticulatus* Peters et *Xiphophorus helleri* Heckel, *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensa*. 57: 127, 1973)

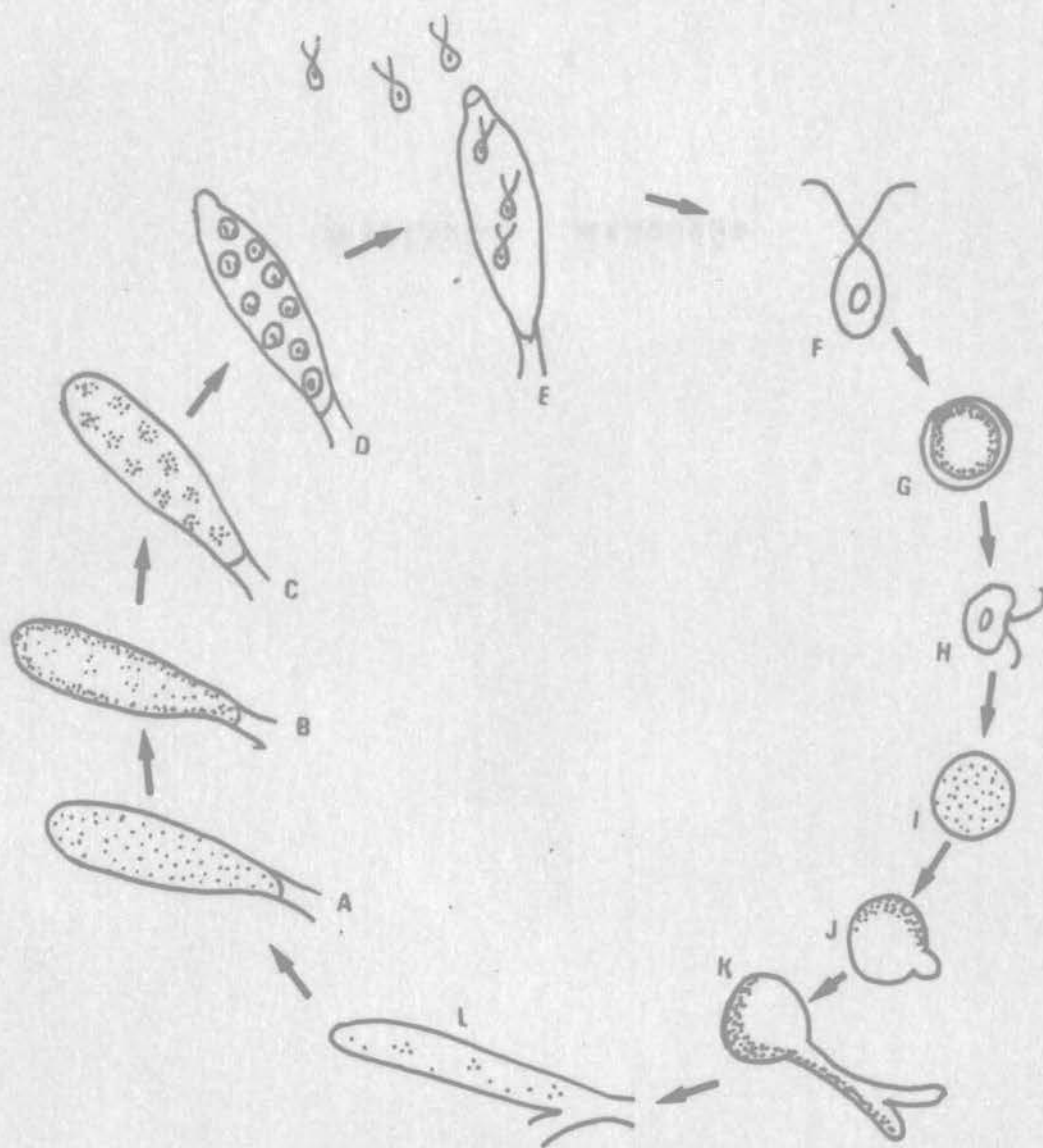


Fig 2. Ciclo de reproducción asexual de *Saprolegnia*. A-B. Acumulación de citoplasma en el extremo de un filamento. C-D. Formación de zoosporas. E. Salida de esporas biflageladas por un poro apical. F. Zoospora primaria. G. Quiste. H. Zoospora secundaria. I. Quiste. J-L Germinación de la zoospora en un nuevo micelio. (Tomado de Nolard-Tintiger, N. Etude experimentale sur l'epidemiologie et la pathogenie de la saprolegniose chez *Lebistes reticulatus* Peters et *Xiphophorus helleri* Heckel, *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensa*. 57:127, 1973)

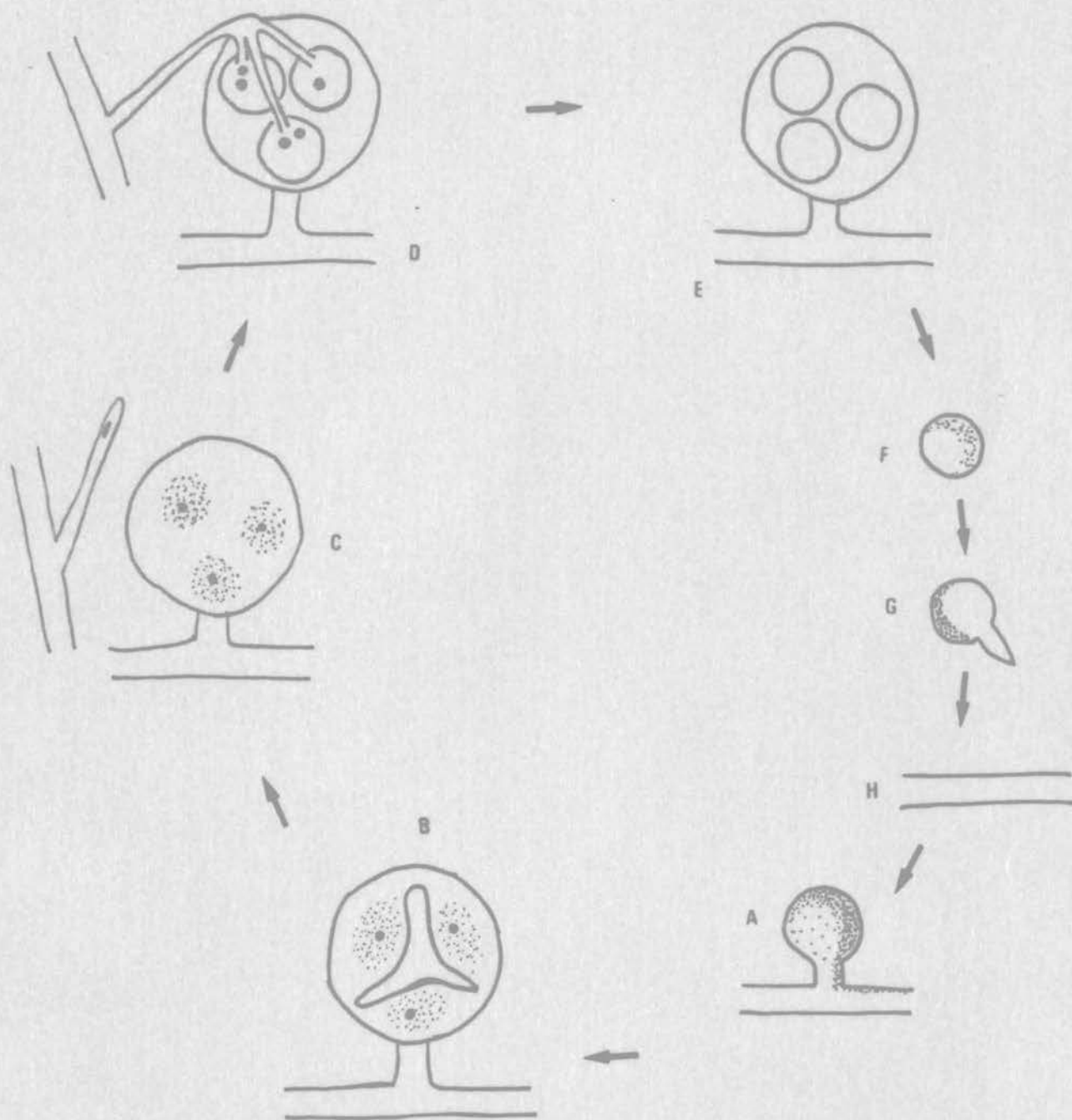


Fig 3. Ciclo de reproducción sexual de *Saprolegnia*. A. Oogonio en formación. B. La vacuola determina las porciones del citoplasma. C. Formación de oosferas en el anteridio. D. Fecundación de oosferas. E. Oogonio y oosferas en maduración F-H. Liberación de la oospora germinada para la formación de un nuevo micelio. (Tomado de Nolard-Tintiger, N. Etude experimentale sur l'epidemiologie et la pathogenie de la saprolegniose chez *Lebistes reticulatus* Peters et *Xiphophorus helleri* Heckel, *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensa*. 57:127, 1973)

capaz de invadir a peces sometidos al *stress* provocado por manipulación inadecuada, desnutrición, sobrepoblación, o infecciones parasitarias o bacterianas concomitantes. Los factores de *stress* físico que más favorecen infecciones son los cambios en la temperatura del agua, de su pH y la alta salinidad.

Hasta la fecha, se han identificado sólo seis géneros de oomicetos (*Achyla*, *Aphanomyces*, *Leptolegnia*, *Leptomitus*, *Pythiopsis* y *Saprolegnia*) habitantes de aguas dulces, y de *Saprolegnia* se reconoce como patógeno a un complejo de *S. parasitica-diclina* y algunas especies "estériles" (sin estructuras sexuales), denominadas como *Saprolegnia* spp. Sin embargo, no todos los hongos aislados corresponden a agentes patógenos y tampoco al orden Saprolegniales. Los miembros de la familia *Saprolegniaceae* que se comportan como patógenos primarios en condiciones experimentales incluyen a *Achyla bisexualis*, *Achyla flagellata*, *Achyla* sp, *Dictyuchus* sp, *Saprolegnia delica*, *Saprolegnia diclina* Tipo I (*Saprolegnia parasitica*), *Saprolegnia ferax*, *Saprolegnia monoica*, *Saprolegnia* sp (36).

La saprolegniasis fue citada por Hoshina en 1960 y Hoshina, y por Ookubo en 1956 (citado en 40) en anguilas cultivadas que no habían sufrido ningún daño anterior visible. Algunos trabajos citados por Richards y Pickering en 1978 (citado en 40) demostraron que en los brotes de saprolegniasis de la trucha fario adquirida en el momento de la puesta, existía casi siempre una forma de *Saprolegnia* con un bajo porcentaje de sexualidad homotálica. Este hongo parece incapaz de producir estructuras sexuales a pesar de una incubación prolongada en diferentes medios, excepto en condiciones de baja temperatura.

La temperatura óptima para el crecimiento de *Saprolegnia* oscila entre los 15 y los 30°C. La mayor parte de las epizootias surgen cuando las temperaturas son bajas, mientras que las consecutivas a un traumatismo pueden presentarse a cualquier temperatura, siempre que ésta sea compatible con la vida del pez (40). No obstante, la invasión micótica también

puede ser inducida a altas temperaturas relativas (43). La velocidad de la invasión del hongo, está relacionada con la temperatura del medio (25).

El hongo se establece generalmente de forma focal, invadiendo la dermis, y se extiende lateralmente sobre la epidermis. La cutícula del pez está cubierta de una cierta actividad antifúngica (citado en 40), y aunque en algunos casos, como sucede en los salmónidos en reproducción, está ampliamente desarrollada, esto no necesariamente impide el hecho de que la infección fúngica se presente en esta etapa. La invasión de la dermis, conduce rápidamente a un desequilibrio de fluidos orgánicos y una falla circulatoria periférica (*shock*) debido a la pérdida del volumen de sangre circulante. En el caso de las lesiones crónicas, pueden sobrevenir infecciones de tipo bacteriano.

Los hongos crecen generalmente sobre la piel del pez formando lesiones, ya sea como manchas blancas o blanco-grisáceas, focales, aterciopeladas o algodonosas, que pueden observarse a simple vista. El hongo también puede invadir el músculo y ocasionalmente a órganos internos. En este último caso, la vía de diseminación generalmente es intestinal (25).

Existen reportes de que las saprolegnias pueden provocar hasta un 100% de mortalidad en colonias de organismos como el bagre (*Ictalurus punctatus*), que son altamente susceptibles a las infecciones causadas por hongos, cuando se exponen a condiciones ambientales pobres, o a cambios bruscos de temperatura (13). Este hongo crece en materia orgánica en descomposición, por lo que todo pez que presente cualquier tipo de lesión es un candidato a contraer la infección.

En el trabajo realizado por Roth (43) en 1972 se demostró una clara relación entre los niveles aumentados de estradiol, progesterona o TSH y la incidencia de infecciones

micóticas en peces de agua dulce (*Catostomus commersonii commersonii* Lacépède), y se sugirió que este efecto se encontraba relacionado con la disminución de la formación de anticuerpos y la supresión de la reacción inflamatoria. En el mismo trabajo, Roth señaló que algunos tipos de *stress* fisiológico, que alteran la producción de algunas hormonas (en particular, el *stress* que promueve la producción de corticoesteroides), sumado a las bajas temperaturas, podrían favorecer aún más la capacidad y velocidad de crecimiento de los hongos. Neish y Hughes (citado en 36) en 1980 postularon la existencia de un vínculo directo entre el incremento de los niveles de corticoesteroides en el plasma, inducido por *stress*, y la susceptibilidad de los peces a infecciones causadas por *Saprolegnia*. En una recopilación hecha por Pickering y Willoughby (36) en 1986, se encontró que el tratamiento de la trucha arcoiris con cortisol, es capaz de inducir el desarrollo de infecciones fúngicas y las ocasionadas por *Ichthyophthirius multifiliis*, y que de manera natural, en las hembras existe un incremento de 5 veces los niveles séricos de cortisol durante la época de ovulación; época en la que se ha observado que es más susceptible. Por el contrario, en el caso de la trucha arcoiris en cautiverio, el incremento en la susceptibilidad hacia parásitos de la piel durante la maduración sexual, no parece estar relacionado con los niveles de cortisol sanguíneo (36, 43).

El diagnóstico se realiza básicamente por la observación directa de las lesiones o las manchas en la piel. La confirmación se hace por la observación microscópica de una impronta o un raspado directo de la lesión. Las hifas de *Saprolegnia* se observan como filamentos largos, no septados de aproximadamente 20 mm de diámetro, y se caracterizan por tener un zoosporangio con una papila apical que contiene en su interior las zoosporas biflageladas. Para su identificación se siembra en medios específicos para el estudio de la morfología colonial y las estructuras microscópicas (25).

Existen diferentes procedimientos terapéuticos para el control de la enfermedad. Uno de los fungicidas más efectivos es el verde de malaquita; sin embargo, no es recomendado para tratamientos prolongados debido a su potencial efecto teratogénico (7). Puede ser aplicado en diferentes formas:

1. Por inmersión del pez en una solución diluida durante 10-30 s.
2. Tratamiento durante 1 h con concentraciones entre 0.3-1.0 ppm, según el tipo y el tamaño del pez.
3. Tratamiento prolongado con concentraciones menores a 1 ppm según el tipo de pez.

Las saprolegnias también pueden ser tratadas por inmersión de los peces infectados en una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 1-5% durante 10-30 segundos, o bien en una solución al 5% durante 1-2 minutos, para aquellos peces que toleran altas concentraciones de sal. El crecimiento del hongo también puede reducirse por inmersión de los peces en una solución de ácido acético al 5% durante 30-60 segundos o en formol (1:10 000) adicionado con verde de malaquita, durante una hora (25, 32).

C. SISTEMA INMUNOLOGICO EN PECES

La inmunidad es un mecanismo fisiológico que provee a los animales de un sistema de protección contra infecciones, y de homeostasis interna.

Las principales características de la respuesta inmunológica descritas para los mamíferos aparecen desde los peces: es **inducible**, debido a que sólo se manifiesta cuando hay un agente inductor, llamado antígeno; es **específica**, un sujeto inmunizado con un antígeno

dado no presenta inmunidad hacia otro antígeno diferente; posee **memoria**, un segundo contacto con el antígeno que originó una respuesta de tipo primario da por resultado una respuesta más rápida y vigorosa (respuesta secundaria); y es **transferible** de un sujeto inmune a otro que no lo es, ya sea por medio de suero que contenga anticuerpos, por linfocitos T sensibilizados o por extractos celulares (42).

La inmunidad adquirida comprende la **respuesta humoral**, reconocida por la producción de inmunoglobulinas, y la **respuesta celular** ejemplificada por el rechazo a injertos y la reacción de hipersensibilidad tardía.

Los anticuerpos pueden realizar funciones esenciales diversas; la mayoría aparecen como defensa contra infecciones bacterianas y virales, participan en los procesos de reconocimiento de transplantes de tejidos extraños y, en general, el reconocimiento de toda sustancia extraña al organismo.

1. Inmunidad de secreciones.

La secreción por células mucosas es una característica de la epidermis de todos los peces teleósteos y muchos otros vertebrados acuáticos. Algunas hipótesis han tratado de plantear la función de estas células. Es probable que la continua renovación del moco prevenga la colonización por parásitos, hongos y bacterias. Es posible que el papel protector que juegan estas células esté mediado por funciones inmunoquímicas o químicas específicas (34).

Desde 1957 en el trabajo publicado por van Oosten (citado en 34) se sugiere que la producción de moco protege al pez contra infecciones. En trabajos realizados con *Saprolegnia* en trucha se observó que la infección se desarrolla primero en las aletas, donde

no hay secreción de moco, y después se extiende al resto del cuerpo (citados en 34).

La composición química del moco es especialmente glicoproteica. Algunas funciones biológicas atribuidas a la capa de moco de los peces son la lubricación, la osmoregulación y locomoción, y una barrera protectora mecánica (24).

Cameron y Endean (1973) han reportado previamente (citados en 24), la resistencia mediada a través del moco de la piel de los peces hacia ciertos parásitos. En el pez bruja del Pacífico existe evidencia de la presencia de aglutininas y lisinas en el moco; algunos de los componentes reportados incluyen hemaglutininas sensitivas al calor, y se relacionan inmunológicamente con las encontradas en el suero (24).

Harrell y col en 1976, reportaron que en el moco de truchas sin infección exhibían actividades vibriostáticas y vibriocidas. El complemento está implicado en la acción antibacteriana y se ha concluido que el moco encontrado en el cuerpo y en el intestino podrían representar la primera línea de defensa antimicrobiana. En adición, la lisozima también es detectada en el moco de la piel de los peces (citados en 24).

La cantidad de moco secretado por las células epidérmicas puede variar. Ésta se incrementa en los peces como resultado de una infección o de la manipulación (24). En muchos casos parece ser que la secreción de moco refleja el grado de resistencia inicial a la invasión de una variedad de agentes potencialmente infecciosos (24).

Las secreciones mucosas de mamíferos contienen grandes cantidades de inmunoglobulinas, principalmente IgA, que son el resultado del transporte específico por células epiteliales o hepatocitos hacia moco o bilis, respectivamente. Algunos autores han sugerido la existencia de un sistema inmune de secreciones en teleósteos, que se manifiesta luego de una

inmunización oral o por inmersión, encontrándose antígenos específicos en moco de la piel o en bilis, pero de forma escasa o no detectable en el suero. Además altos niveles de anticuerpos específicos o anticuerpos marcados de suero se transportaron de forma muy pobre hacia secreciones mucosas. Estos datos sugieren que existen diferencias entre los antígenos que inducen anticuerpos séricos (sIg) y los antígenos que específicamente inducen anticuerpos en moco (mIg). En *Archosargus probatocephalus* no se han encontrado estas diferencias entre ambas Ig's (41).

Rombout y col (41) encontraron varias similitudes entre las Ig's que estudiaron: a. Ambas se presentaron en forma tetramérica predominantemente, aunque se presentaron también formas diméricas y monoméricas. b. Ambas contienen cadenas pesadas (H), de ± 70 KDa y cadenas ligeras (L), de ± 25 KDa. c. Ambas son reactivas con WC1, un anticuerpo monoclonal (AcMo) producido contra inmunoglobulinas de suero de carpa. Sin embargo, existe una clara diferencia entre estas dos Ig's, los AcMo WC1 M1 y WC1 M2 reconocieron a la cadena pesada de la mIg, pero no a la cadena pesada de la sIg, indicando diferencias en la composición de las cadenas pesadas de ambas Ig's.

Di Conza y Halliday (14) sugirieron que los anticuerpos mucosos de *T. australis* se sintetizan localmente en vez de derivar del plasma. Esto se encuentra sustentado por las investigaciones realizadas por Di Conza en 1970 (citado en 14), quien plantea claras diferencias entre las hemaglutininas naturales encontradas en el suero y las encontradas en la mucosidad de la piel. Adicionalmente, se han encontrado hemaglutininas no naturales en la mucosidad intestinal, aunque al analizar la mucosidad de la piel y el suero se encontraron resultados positivos también. Al examinar cortes de tejido de piel e intestino se encontraron células linfoides en ambos casos. Estas células podrían estar involucradas en la síntesis local de anticuerpos. Recientemente, también se ha sugerido la síntesis de anticuerpos por células del intestino y de la epidermis(14). En contraste con otros peces,

como la platija, parece ser que los anticuerpos contenidos en el moco son similares a los encontrados en el suero (14).

Algunos autores han encontrado anticuerpos específicos en moco contra agentes infecciosos. Harris (citado en 31) detectó anticuerpos precipitantes hacia el helminto *Pomphorhynchus laevis* en el moco intestinal del cacho (*Leuciscus cephalus*); Hines y Spira (citado en 31) encontraron que en la mucosidad del cuerpo de la carpa espejo (*Cyprinus carpio*) se localizaban anticuerpos específicos hacia *Ichthyophthirius multifiliis*; en estos estudios también se encontraron anticuerpos en el suero (31).

En el bagre, los linfocitos frecuentemente se encuentran migrando de la superficie del tejido epitelial, aunque el significado de esta observación se desconoce (31). Los anticuerpos encontrados en las mucosidades de la piel probablemente se originan del suero por transpiración, y es posible que se produzcan localmente por linfocitos a partir de estímulos antigénicos en la superficie (31).

Las técnicas que emplean anticuerpos fluorescentes indican que las células productoras de inmunoglobulinas se encuentran presentes en la capa cubierta de moco y en la subepidermis de la piel de truchas no inmunizadas. La asociación cercana con la mucosa epitelial de la superficie del cuerpo sugiere que es un mecanismo de defensa activo inmunológicamente y apoya la hipótesis de que los peces, al igual que los mamíferos, poseen un sistema inmunosecretor, el cual podría operar junto con el sistema de circulación de inmunoglobulinas séricas (47).

Las células plasmáticas subepidérmicas podrían ser las responsables de la producción de una parte de las Ig de mucosas. Esto se confirma por la observación de manchas fluorescentes positivas entre las células del epitelio, sugiriendo el transporte intercelular

de Ig a partir de células plasmáticas dérmicas hacia la superficie externa de la piel (47).

2. Factores que afectan la respuesta inmune en peces.

a. Temperatura. El rasgo característico de los animales poiquiloterms es la influencia de la temperatura del medio sobre la respuesta inmune. La producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células se suprimen cuando los animales inmunizados se mantienen a temperaturas por debajo de la temperatura ambiental (11). Se ha determinado que existe un intervalo de temperatura adecuado para la formación de inmunoglobulinas, fuera del cual es posible la atenuación, o incluso la completa anulación de la formación de anticuerpos (39).

La primera fase de la respuesta inmunológica incluye la captación, el procesamiento y la presentación del antígeno, fenómeno independiente de la temperatura (11). El inicio de la producción de anticuerpos luego de la interacción entre células puede ser afectada por la temperatura. Este fenómeno se ha tratado de explicar como un bloqueo en la actividad de las células T cooperadoras (12), o como un incremento en la actividad de una supuesta población de células T con actividad supresora a bajas temperaturas (39). La multiplicación celular y la diferenciación de las células B son eventos también considerados independientes de la temperatura (39). Cuando existe una nueva exposición del pez a una temperatura óptima para la producción de anticuerpos, se permite su síntesis y liberación.

b. Factores conductuales. Al parecer existe una estrecha relación entre la posición jerárquica de los organismos y la respuesta de anticuerpos. Los resultados obtenidos en carpas mantenidas a 20°C demostraron que sólo los miembros dominantes del grupo producían anticuerpos al ser infectados experimentalmente con tripanosomas (40).

Se han estudiado pocos factores de conducta entre los peces en lo referente a su efecto sobre la capacidad de la respuesta inmune. Dichos factores incluyen la relación de sexos en la población, y la presencia de feromonas que podrían ser liberadas como respuesta a condiciones adversas, como la alta densidad de población, la manipulación, y las condiciones de iluminación. Existe evidencia experimental acerca de la reducción de la respuesta inmune en guramis infectados con el virus de la necrosis pancreática viral, al mantenerlos en una muy alta densidad de población (40).

3. Inmunoglobulinas en pez: estructura y función.

Se han encontrado e identificado moléculas con actividad de inmunoglobulinas en todas las especies de vertebrados investigados, aunque la evidencia existente es incierta, inconclusa y contradictoria en ciclostomos, (p. ej. lampreas) en quienes se han detectado moléculas que han sido identificadas como remanentes de IgM (24).

En yemas de huevo de salmón se han identificado proteínas estructural y antigénicamente idénticas a la IgM presente en el suero de los salmones (22). Hayman y Lobb (19) detectaron la presencia de inmunoglobulinas en yemas de huevecillos fertilizados de bagre. En estos estudios se demostró que la forma tetramérica de la inmunoglobulina contenida en la yema de los huevecillos es estructuralmente similar a la encontrada en el suero. Existen otros trabajos que han reportado la presencia de anticuerpos en huevos de pez (citados en 22). Trabajo en carpas sugiere que las Ig en los huevecillos son de origen materno.

Recientes estudios han demostrado que la IgM purificada (19S) del plasma del tiburón es capaz de mediar fenómenos de toxicidad, muy parecidos a la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) descrita en mamíferos

(33).

La macroglobulina presente en varias especies de peces óseos se encuentra en circulación de forma tetramérica (14-16S), pero también puede presentarse en forma monomérica. En los elasmobranquios se encontraron inmunoglobulinas parecidas a la IgM de mamíferos con estructura pentamérica (17-19S) y monomérica (7S) (37).

Recientes estudios de IgM en vertebrados inferiores, han dado a conocer que la forma pentamérica no es universal para este tipo de inmunoglobulina. Se ha reportado la existencia de formas hexaméricas o tetraméricas de IgM para macroglobulinas de anfibios y peces óseos (1, 18, 20).

Kobayashi y col. (27) aislaron tres inmunoglobulinas del suero del tiburón con diferentes pesos moleculares: la Ig HMW (inmunoglobulina de alto peso molecular) de 900 KDa, la Ig IMW (inmunoglobulina de peso molecular intermedio) de 300 KDa y la Ig LMW (inmunoglobulina de bajo peso molecular) de 150 KDa. Las Ig's IMW y LMW poseen antigenicidad idéntica, y son definidas como del mismo isotipo. Los análisis antigénicos entre la Ig HMW y la Ig LMW demostraron epitopes específicos en cada molécula. Kobayashi y col. en 1984 (26), aislaron dos distintas inmunoglobulinas de la raya (*Raja kenoyei*): la HMW y la LMW. La Ig HMW posee un coeficiente de sedimentación de 18S y un peso molecular de 840 KDa; podría ser definida como la IgM y posee una estructura pentamérica. La LMW de la raya es un dímero que posee un coeficiente de sedimentación de 9S y un peso molecular de 320 KDa, cuyos monómeros están asociados por enlaces covalentes.

De acuerdo con los datos acumulados se sugiere que muchos teleósteos poseen solamente una inmunoglobulina de alto peso molecular, sin embargo los reportes elaborados por Uhr, Finkelstein y Franklin en 1962 (29) mantienen que el pez dorado produce ambos

anticuerpos 19S y 7S en respuesta a la inmunización con el bacteriofago ØX174.

4. Respuesta inmune hacia infecciones.

Los mecanismos efectores anti-parasitarios incluyen eventos celulares y eventos humorales. En céstodos se ha observado resistencia mediada por tres células parecidas a macrófagos. Recientemente se han reconocido células citotóxicas no específicas (CCNE) en la respuesta inmune de teleósteos, como el bagre, que reconocen una variedad de células blanco humanas y murinas (16).

Se ha establecido que una de las infecciones en peces ornamentales que presenta más pérdidas a nivel económico y de organismos es ocasionada por protozoarios parásitos (*Ichthyophthirius multifiliis*, *Oodinium pillularis*, *Trichodina* sp, *Ichthyobodo necatrix* o *Chilodonella cyprini*). Se han recomendado para su control terapias físicas, quimioterapias y electroterapias. Sin embargo, estos tratamientos pueden dejar efectos secundarios que se ven reflejados en las condiciones del organismo posteriores a su tratamiento (28).

Actualmente se reconoce que puede inducirse protección contra enfermedades causadas por protozoarios como *Ichthyophthirius multifiliis*, y a la fecha se han logrado desarrollar vacunas contra este agente aunque en forma limitada, ya que existen problemas técnicos en cuanto a la obtención de suficiente antígeno para la inmunización (23).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

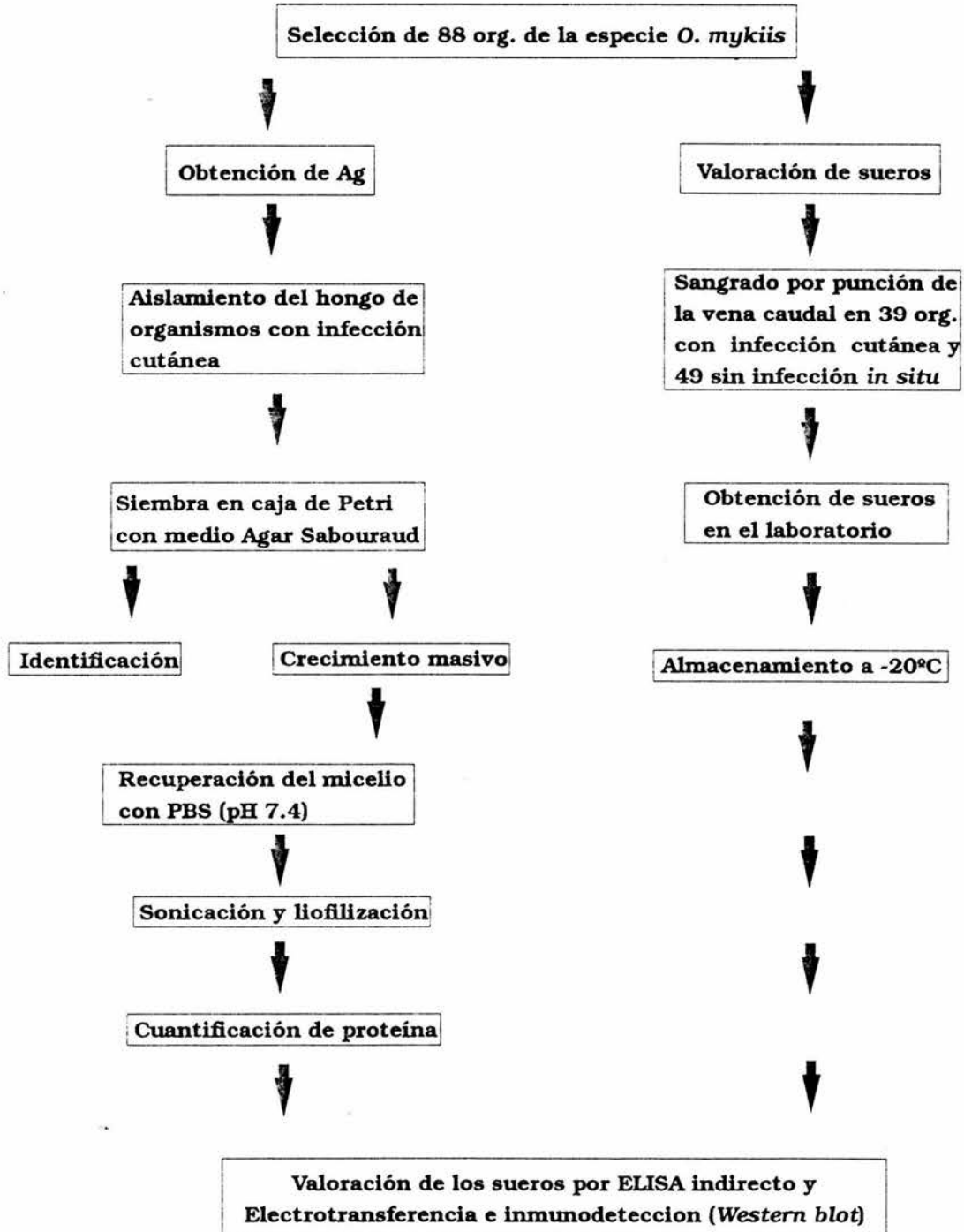
EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ANTE UNA INFECCION MICOTICA EN TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) DEL CENTRO ACUICOLA "EL ZARCO".

OBJETIVOS PARTICULARES:

- A. Identificación de cepas de los principales hongos que infectan a la trucha arcoiris dentro del centro acuícola "El Zarco".
- B. Preparación de un antígeno soluble a partir de las cepas de hongos aisladas.
- C. Determinación de la presencia de anticuerpos específicos en sangre periférica de animales con infección cutánea y sin infección aparente.
- D. Definición de los componentes antigénicos de *Saprolegnia* reconocidos por anticuerpos séricos de animales infectados.

MATERIAL Y METODOS

Cuadro de Flujo



MATERIAL Y METODOS

PECES. Se estudiaron 39 organismos con infección cutánea y 49 organismos no infectados, de la especie *Oncorhynchus mykiss*, de sexo indistinto, de aproximadamente 30 cm de longitud, del Centro Acuícola "El Zarco", que se localiza en el Km 32.5 de la carretera México-Toluca, cercano al poblado de la Marqueza, Edo. de México (Fig. 4). Los animales sanos se seleccionaron al azar de la batería de estanques de animales reproductores; los animales infectados se mantuvieron en estanques aislados.

OBTENCION DE SUERO. Se tomaron muestras de sangre de los peces infectados y de los no infectados, por punción de la vena o arteria caudal (Fig. 5), utilizando una jeringa hipodérmica con aguja de calibre 22. Se colectó la sangre en tubos que fueron trasladados al laboratorio, donde se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos. El suero recuperado se mantuvo en tubos Eppendorf a -20°C hasta su uso.

AISLAMIENTO DEL HONGO. Con la ayuda de un isopo estéril, se hizo un raspado de la lesión sobre la piel de los animales infectados; esta muestra se sembró en dos tubos estériles con agar Sabouraud. Las muestras se trasladaron al laboratorio para el aislamiento e identificación del hongo recuperado. Esta última etapa se realizó en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la U.N.A.M., a cargo del Dr. Roberto Cervantes O., y en la Facultad de Ciencias Biológicas, de la U.A.N.L., por el M. en C. Juan Manuel Adame.

PREPARACION DEL ANTIGENO. Las cepas de hongo aisladas se sembraron en cajas de Petri conteniendo agar Sabouraud, y se incubaron a temperatura ambiente. Después de cuatro días, se agregó solución salina de fosfatos estéril (PBS) 0.1M, pH 7.4, y se recuperó el micelio crecido; éste se sometió a sonicación durante 5 min en un sonicador New

Brunswick. La masa de micelio sonicada se recuperó y se centrifugó durante 10 minutos a 400 x g. El sobrenadante recuperado se repartió en fracciones de 1 ml en frascos ampolla y se liofilizó (10). Los frascos conteniendo el antígeno liofilizado se guardaron a -20°C hasta su uso. El contenido de proteína fue cuantificado por la técnica descrita por Bradford (9).

INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA). Los anticuerpos específicos contra los antígenos de cada cepa se determinaron por el método indirecto de ELISA descrita originalmente por Bortz y col (8), con algunas modificaciones. A cada pozo de una microplaca de titulación se le colocaron 100 μ l de la solución de antígeno a una concentración de 2 μ g/ml diluido en amortiguador de carbonatos, pH 9.6. La placa se incubó en refrigeración durante toda la noche para permitir la adsorción del antígeno a la fase sólida. Para bloquear los sitios del soporte sólido no ocupados por el antígeno, se adicionaron 100 μ l de leche descremada, al 2% en solución salina de fosfatos 0.1M, pH 7.4, adicionado de 0.05% de Tween 20 (PBS-T). Se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. La placa se lavó 3 veces con PBS-T, y se adicionó, por duplicado, el suero del animal correspondiente, diluido 1:25 en PBS-T conteniendo 2% de leche descremada. Se incubó a 8°C durante 45 minutos. Los pozos se lavaron de 5-6 veces con PBS-T. A cada pozo se agregaron 100 μ l de IgG de chivo anti-Ig trucha, acoplado con peroxidasa (Kirkegaard & Perry, Lab. Inc.) diluido 1:100 en PBS-T. Se incubó durante 60 minutos a 8°C. Se lavó 5-6 veces con PBS-T. Finalmente, se adicionaron 100 μ l del sustrato (10 μ l de H₂O₂ + 10 mg de orto-fenilén diamina, en 25 ml de amortiguador de citratos pH 5.0). La reacción enzimática se detuvo por la adición de una gota de H₂SO₄ 8N. El color desarrollado se leyó en un lector de ELISA (Multiskan Plus P) con un filtro de 492 nm. Como testigos se utilizaron pozos que no se sensibilizaron con Ag, pero que se les agregó suero, pozos sensibilizados con Ag, los cuales se incubaron con PBS-T en lugar de suero, y pozos incubados sin Ag y sin suero (Fig. 6).

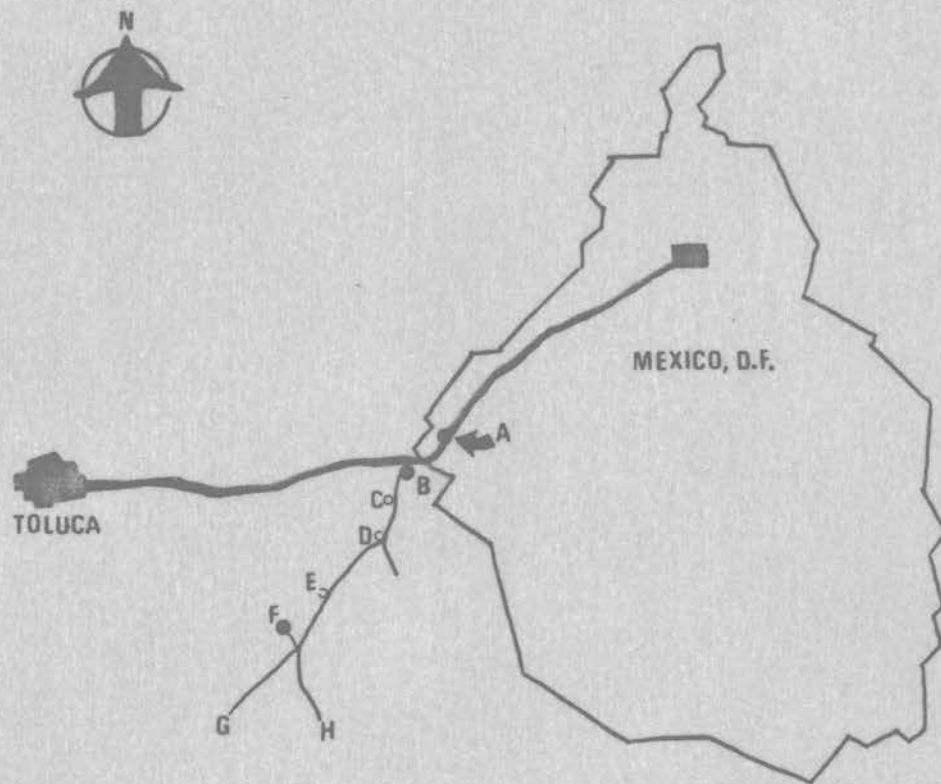


Fig 4. Mapa de localización del Centro Acuícola "El Zarco".

- A.** El Zarco km 32.5 (Carretera México-Toluca).
- B.** La Marquesa.
- C.** Valle del conejo.
- D.** A Atlapulco.
- E.** El Potrero.
- F.** Guadalupe Victoria.
- G.** A San Miguel Almalla.
- H.** A Tenango del Valle.

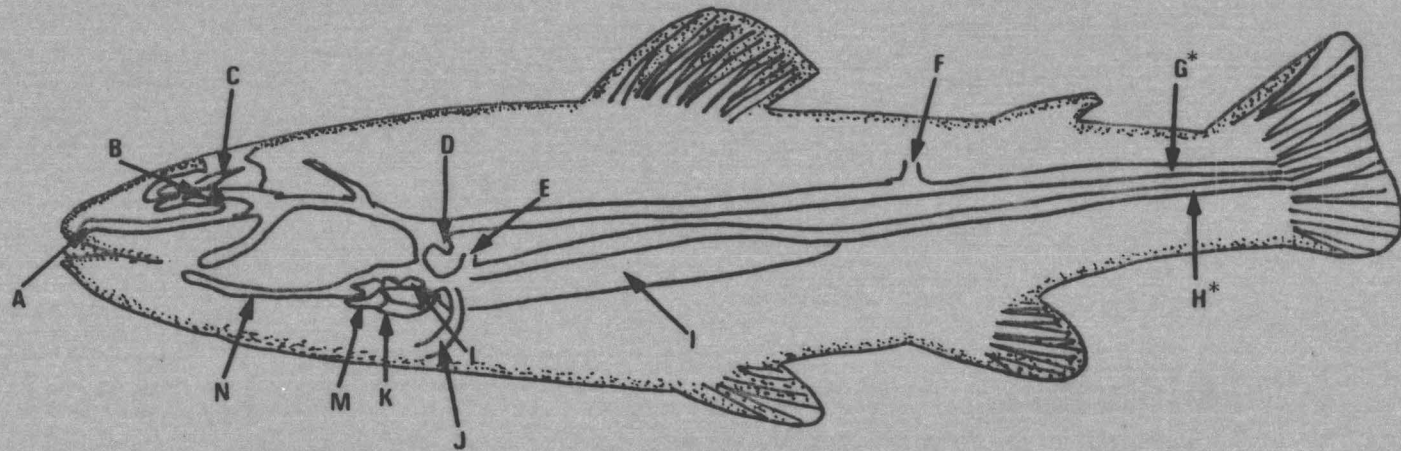
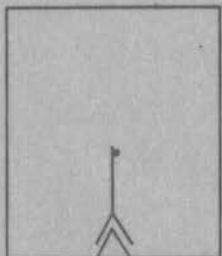


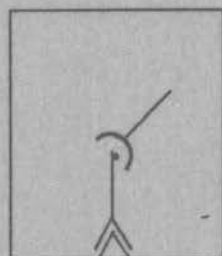
Fig 5. Sistema circulatorio en trucha arcoiris. A. Vena facial anterior. B. Vena orbital. C. Vena encefálica. D. Vena subclaviana. E. Vena hepática. F. Aorta lateral. G*. Arteria caudal. H*. Vena caudal. I. Riñón. J. Vena iliaca. K. Ventrículo. L. Atrio. M. Aorta. N. Vena yugular (Basado en Lagler y otros, *Ichthyology*. John, Wiley & Sons. USA. 506 pp, 1977)



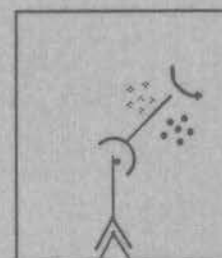
ADSORBER EL ANTIGENO A LA FASE SOLIDA (UNA PLACA PARA CADA Ag)



ADICIONAR EL SUERO DILUIDO 1:25



ADICIONAR EL CONJUGADO ANTI-Ig DE TRUCHA ACOPLADO A PEROXIDASA



ADICIONAR EL SUSTRATO DE LA ENZIMA

LEER DENSIDAD OPTICA 492 nm

Fig 6. Método indirecto de ELISA

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

A. Preparación de geles de poliacrilamida al 12.5%.

Se lavaron dos placas de vidrio con detergente neutro, se enjuagaron con agua bidestilada y se limpiaron con una solución de metanol:ácido acético (v/v).

En un matraz Kitasato de 125 ml se colocaron los siguientes reactivos para formar el gel separador:

Solución de monómeros (acrilamida 30%-bisacrilamida 8%)	4.800 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	3.000ml
SDS al 10%	0.240 ml
H ₂ O bidestilada	4.000 ml

se hizo vacío durante 10 min

Persulfato de amonio al 10%	0.100ml
N, N, N', N'-Tetrametil-etilenediamina (TEMED)	0.008 ml

La mezcla se vertió cuidadosamente entre las placas de vidrio, hasta 3.5 cm antes del borde superior. Inmediatamente se agregó 1.0 ml de H₂O sobre la superficie de la mezcla de monómeros, y se dejó reposar a temperatura ambiente para permitir la gelificación. Después de la gelificación, la superficie del gel se lavó perfectamente con agua bidestilada, y se eliminó el líquido de la superficie del gel. Luego, se colocaron en un matraz Kitasato los siguientes reactivos, para formar el gel concentrador:

Solución de monómeros (acrilamida 30%-bisacrilamida 8%)	0.660 ml
--	----------

Tris 0.5 M pH 6.8	1.000 ml
SDS al 10%	0.080 ml
H ₂ O bidestilada	2.400 ml

Se hizo vacío durante 10 min

Persulfato de amonio al 10%	0.080 ml
N, N, N', N'-Tetrametil-etilenediamina (TEMED)	0.006 ml

Esta mezcla se adicionó sobre el gel separador, e inmediatamente se colocó un peine ciego con un diente para los marcadores de peso molecular. Se incubó a temperatura ambiente para permitir la gelificación.

B. Preparación de la muestra.

Las muestras liofilizadas, se reconstituyeron con agua bidestilada y desmineralizada, hasta una concentración de 250 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$. Cada muestra se mezcló con regulador de muestra 5X y se incubó en baño maría a ebullición durante 10 min. Se utilizaron marcadores de peso molecular (Dalton Mark VII-L, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), los cuales se prepararon según las instrucciones del fabricante.

C. Corrimiento electroforético.

Antes de aplicar las muestras al gel de poliacrilamida, se retiró el peine y los pozos se enjuagaron con agua bidestilada. Con ayuda de una jeringa Hamilton, se colocaron aproximadamente 200 μl de cada muestra en los pozos correspondientes. En el último carril se adicionaron 10 μl de la mezcla de marcadores de peso molecular. La jeringa se lavó perfectamente con SDS al 1% después de que se colocó cada muestra. El corrimiento electroforético se realizó a 20 mA de corriente constante, con una fuente de poder BIO-RAD.

D. Electrotransferencia.

Se cortó un pedazo de un tamaño aproximado de 10 X 10 cm, de papel de nitrocelulosa (NC) de 0.45 mm de poro. El papel junto con cuatro cuadros de igual tamaño de papel filtro y dos esponjas "Scotch Brite" se humedecieron con regulador de transferencia (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, pH 8.3, metanol 20% v/v). Se tomó un "cassette" del aparato de transferencia y se colocó una esponja, sobre ella se colocaron dos cuadros de papel filtro y sobre éste, el papel de nitrocelulosa. Luego, sobre el papel de nitrocelulosa se colocó el gel, en el cual se realizaron las marcas necesarias para ubicar la dirección de corrimiento del gel; finalmente, sobre el gel se colocaron dos cortes de papel filtro y luego una esponja. Enseguida se cerró el "cassette" y se colocó en la cámara de transferencia, cuidando que el gel quedara del lado del cátodo. La transferencia se realizó en 5-6 h a 750 mA con una fuente de poder BIO-RAD. Al término de la transferencia se recuperó el papel de nitrocelulosa para detectar las proteínas transferidas. Se cortó el fragmento de papel donde se encontraban los marcadores de peso molecular y se tiñó con rojo de Ponceau.

D. Immunodetección.

El papel de NC con las proteínas transferidas fue cortado en tiras de 0.5 cm de ancho, las cuales se colocaron en un envase que contenía regulador de bloqueo (2% de leche descremada y 2.5% de EDTA en PBS-T), y se incubaron a 37°C durante 1 h. Las tiras se lavaron con PBS-T y se sumergieron en cestos individuales conteniendo la solución de suero diluido 1:5, de cada organismo, y se incubaron a 37°C durante 1 h y toda la noche a 4°C. Nuevamente se lavaron las tiras de papel NC con PBS-T 0.1%, 10 veces, 1 min cada vez, y se agregó el anticuerpo de chivo anti-trucha marcado con peroxidasa (Kirkegaard & Perry, Lab. Inc.) , a una dilución 1:50 en regulador de bloqueo. Se incubó 1 h a 37°C, y después se hicieron 7 lavados de 1 min cada uno con PBS-T y después 10 lavados con PBS

sin Tween. Finalmente, se agregó el sustrato de la peroxidasa, y se incubó a temperatura ambiente en un lugar oscuro, durante 10 minutos. Al aparecer las bandas se enjuagó con agua corriente y las tiras de papel se dejaron secar al aire. Una vez secos los papeles, se analizaron y determinaron los pesos moleculares de las proteínas reconocidas por los sueros.

RESULTADOS

RESULTADOS

En el presente trabajo, las cepas de hongos que se aislaron de los organismos con infecciones cutáneas del Centro Acuícola "El Zarco", fueron identificadas solamente hasta género, y correspondieron al género *Saprolegnia*. Un aislamiento resultó ser una mezcla de *Saprolegnia* y *Mucor*. La identificación de la especie, no es muy fácil, ya que para la identificación de la especie, es necesario el estudio microscópico de estructuras sexuales, tales como la oogonia y el anteridio, que sólo se inducen *in vitro* haciendo crecer al hongo sobre semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*) (36, 40). Se tomaron para su estudio a aislamientos que aparentemente representaban a diferentes especies, de acuerdo a su velocidad y temperatura de crecimiento, el pigmento desarrollado y la morfología colonial y microscópica. Destaca el hecho de que casi en la totalidad de los casos, crecieron cepas puras, sin mezclas de especies.

La identificación de las cepas fue llevada hasta género, ya que la forma de identificación se basó fundamentalmente en el análisis del aspecto y el desarrollo de la colonia a diferentes temperaturas y por la observación al microscopio de sus estructuras de reproducción. No se logró la identificación de especie debido a la dificultad que representa la inducción *in vitro* del proceso de reproducción sexual, que es uno de los criterios para su identificación.

La concentración de proteína obtenida en el sobrenadante de cada cepa aislada, después de someterlas a sonicación fue la siguiente:

Cepas de <i>Saprolegnia</i> spp	Cepa mixta (<i>Saprolegnia</i> sp y <i>Mucor</i> sp)
Cepa I. 546 µg/ml	Cepa IV. 636 µg/ml
Cepa II. 368 µg/ml	
Cepa III. 703 µg/ml	

Los peces se agruparon de acuerdo con el tipo de lesión que presentaron. De los 39 organismos muestreados durante los meses de Enero y Febrero, 11 peces mostraron lesiones leves, lesión que se caracterizó por pequeños brotes de color blanco-grisáceo aislados, en la aleta caudal, y en algunos casos en otras partes del cuerpo; 10 de los animales mostraron lesiones moderadas, con ulceraciones y sangrado, de mayor extensión principalmente en branquias, aletas caudal y dorsal; y 18 organismos con lesiones severas caracterizadas por la radiación de la infección a todo el cuerpo con ulceración, necrosis y sangrado; la mayoría de estos animales murieron durante la toma de la muestra.

Las lecturas de densidad óptica obtenidas de las pruebas de ELISA practicadas a los sueros de los organismos muestreados que no presentaban infecciones cutáneas aparentes, obtenidas hacia cada antígeno, se presentan en la Tabla I. Estas lecturas fueron muy bajas en todos los sueros, aunque para la cepa IV (cepa mixta) se encontró un caso extremo con valor de 0.372, que fue el valor máximo reportado para las cuatro cepas analizadas.

TABLA I. Lecturas de densidad óptica de las pruebas de ELISA practicados a los sueros de organismos sin lesiones cutáneas aparentes, del Centro Acuícola "El Zarco", enfrentados a los cuatro antígenos empleados.

N. org.	Cepa I	Cepa II	Cepa III	Cepa IV
1	0.136	0.029	0.105	0.050
2	0.165	0.083	0.119	0.126
3	0.129	0.125	0.135	0.119
4	0.117	0.092	0.066	0.128
5	0.220	0.164	0.234	0.218
6	0.149	0.053	0.211	0.372
7	0.126	0.004	0.208	0.347
8	0.031	0.226	0.062	0.190
9	0.000	0.000	0.078	0.154
10	0.024	0.054	0.217	0.320
11	0.088	0.222	0.190	0.294
12	0.117	0.227	0.119	0.281
13	0.093	0.064	0.144	0.240
14	0.045	0.000	0.064	0.297
15	0.058	0.214	0.154	0.142
16	0.228	0.143	0.258	0.152
17	0.181	0.103	0.270	0.166
18	0.119	0.095	0.178	0.200
19	0.132	0.063	0.223	0.069
20	0.117	0.167	0.229	0.295
21	0.117	0.105	0.141	0.166
22	0.000	0.000	0.000	0.000
23	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.000	0.000	0.252	0.107
25	0.000	0.000	0.000	0.000
26	0.060	0.000	0.207	0.182
27	0.020	0.000	0.165	0.089
28	0.000	0.000	0.000	0.000
29	0.107	0.011	0.000	0.060
30	0.014	0.086	0.108	0.221
31	0.000	0.000	0.000	0.000

32	0.020	0.110	0.037	0.120
33	0.000	0.016	0.000	0.091
34	0.000	0.000	0.000	0.000
35	0.133	0.181	0.127	0.054
36	0.032	0.078	0.124	0.118
37	0.045	0.091	0.000	0.274
38	0.071	0.142	0.000	0.259
39	0.171	0.025	0.052	0.200
40	0.000	0.000	0.000	0.000
41	0.253	0.162	0.193	0.169
42	0.151	0.101	0.035	0.172
43	0.079	0.032	0.113	0.069
44	0.274	0.109	0.23	0.247000
45	0.000	0.000	0.043	0.000
46	0.000	0.000	0.000	0.018
47	0.060	0.006	0.037	0.090
48	0.000	0.000	0.000	0.000
49	0.000	0.000	0.000	0.000
Media	0.079	0.069	0.105	0.140
D. E.	0.076	0.073	0.090	0.108

Cepas I-III: *Saprolegnia* spp

Cepa IV: *Saprolegnia* sp y *Mucor* sp

D.E. : Desviación estándar.

Con los resultados obtenidos de los sueros de estos organismos sin infecciones cutáneas aparentes, se determinó el valor promedio de D.O. para cada antígeno, al cual se le sumaron 2 desviaciones estándar. Este valor se consideró como valor de corte para determinar cuáles organismos con infección cutánea se considerarían como organismos respondedores al antígeno en cuestión.

Valores de corte:

Cepa I	Cepa II	Cepa III	Cepa IV
0.231	0.215	0.285	0.356

Las reactividad de los sueros de los organismos con infecciones cutáneas, ante los cuatro antígenos empleados, se muestra en la Tabla II.

TABLA II. Lecturas de densidad óptica de las pruebas de ELISA practicados a los sueros de organismos con lesiones cutáneas del Centro Acuícola "El Zarco", enfrentados a los cuatro antígenos empleados.

Nº org.	Cepa I	Cepa II	Cepa III	Cepa IV
	0.254	0.210	0.152	0.179
2	2.71	1.516	1.621	1.584
3	2.37	1.372	1.413	1.439
4	0.328	0.221	0.205	0.248
5	0.39	0.296	0.244	0.278
6	0.371	0.276	0.300	0.284
7	2.317	1.383	1.348	1.347
8	1.134	0.968	0.611	0.663
9	2.22	1.415	1.388	1.329
10	1.006	0.848	0.694	0.667
11	2.197	1.279	1.366	1.324
12	2.200	1.341	1.377	1.308
13	0.449	0.310	0.264	0.286
14	0.420	0.284	0.298	0.250
15	2.387	1.390	1.474	1.434
16	1.142	0.908	0.881	0.606
17	0.505	0.310	0.313	0.341
18	0.346	0.227	0.209	0.267

19	0.301	0.215	0.184	0.262
20	0.391	0.238	0.237	0.275
21	0.341	0.224	0.184	0.218
22	2.334	1.472	1.445	1.509
23	1.305	0.984	0.774	0.428
24	0.510	0.329	0.267	0.227
25	0.562	0.379	0.352	0.566
26	0.384	0.255	0.273	0.304
27	1.237	1.047	0.751	0.744
28	0.394	0.241	0.245	0.271
29	2.361	1.736	1.577	1.616
30	0.972	0.754	0.758	0.991
31	1.488	1.333	1.006	1.345
32	0.33	0.191	0.270	0.240
33	0.283	1.193	0.262	0.287
34	0.427	0.289	0.367	0.46
35	0.566	0.374	0.399	0.395
36	2.013	1.530	1.401	1.117
37	0.500	0.399	0.187	0.196
38	0.806	0.271	0.275	0.244
39	0.297	0.259	0.109	0.252
Media	1.040	0.725	0.653	0.661
D. E.	0.822	0.525	0.516	0.501

Cepas I-III: *Saprolegnia* spp

Cepa IV: *Saprolegnia* sp y *Mucor* sp

D. E.: Desviación estándar

Con el criterio de positividad mencionado anteriormente, el porcentaje de organismos positivos encontrado fue el siguiente (Figura 7): 39/39 (100%) de los organismos infectados fueron positivos para la cepa I de *Saprolegnia* sp; 36/39 (92%) fueron positivos para la cepa II de *Saprolegnia* sp; 23/39 (59%) fueron positivos para la cepa

III de *Saprolegnia* sp, y 20/39 (51%) fueron positivos para un aislado mixto de *Saprolegnia* sp y *Mucor* sp.

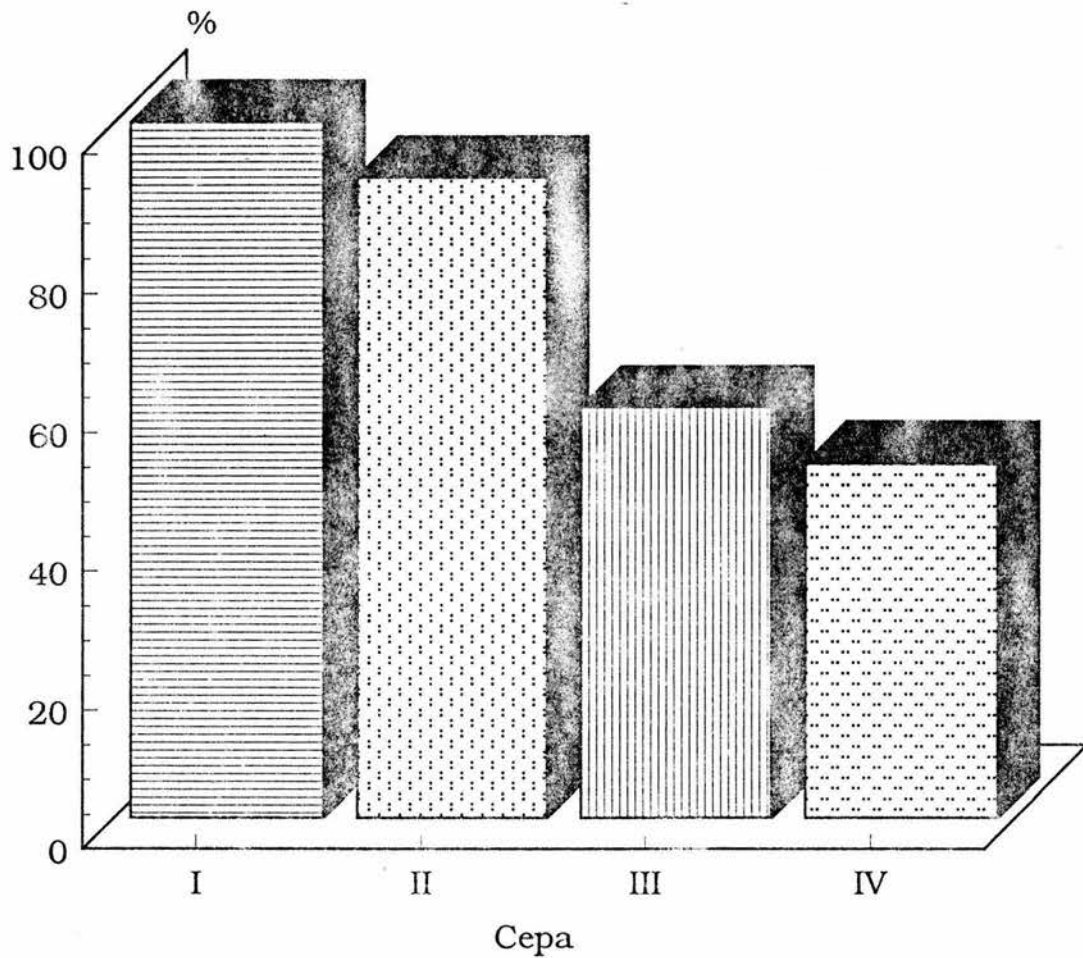


Figura 7. Porcentaje de organismos positivos para las diferentes cepas aisladas de organismos con infecciones cutáneas del Centro Acuicola "El Zarco". Cepa I-III de *Saprolegnia* spp; Cepa IV de *Saprolegnia* sp y *Mucor* sp.

En las tablas III-VI (Figuras 8-11) se muestra el comportamiento promedio de la respuesta de anticuerpos específicos de *Oncorhynchus mykiss*, de acuerdo al tipo de lesión que presentó cada animal.

TABLA III. Lecturas de densidad óptica de las pruebas de ELISA practicados a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando el antígeno de la cepa I de *Saprolegnia* sp

Nº org	Lesión leve	Lesión moderada	Lesión severa
1	0.254	2.710	1.006
2	0.328	2.370	2.197
3	0.390	2.317	2.200
4	0.371	1.340	0.449
5	0.391	2.220	0.420
6	0.341	2.334	2.387
7	0.384	1.305	1.142
8	0.394	0.510	0.505
9	0.330	0.562	0.346
10	0.283	1.237	0.301
11	0.297		2.361
12			0.972
13			1.488
14			0.427
15			0.566
16			2.013
17			0.500
18			0.806
Media	0.342	1.670	1.116
D. E.	0.049	0.811	0.778

D. E. : Desviación estándar

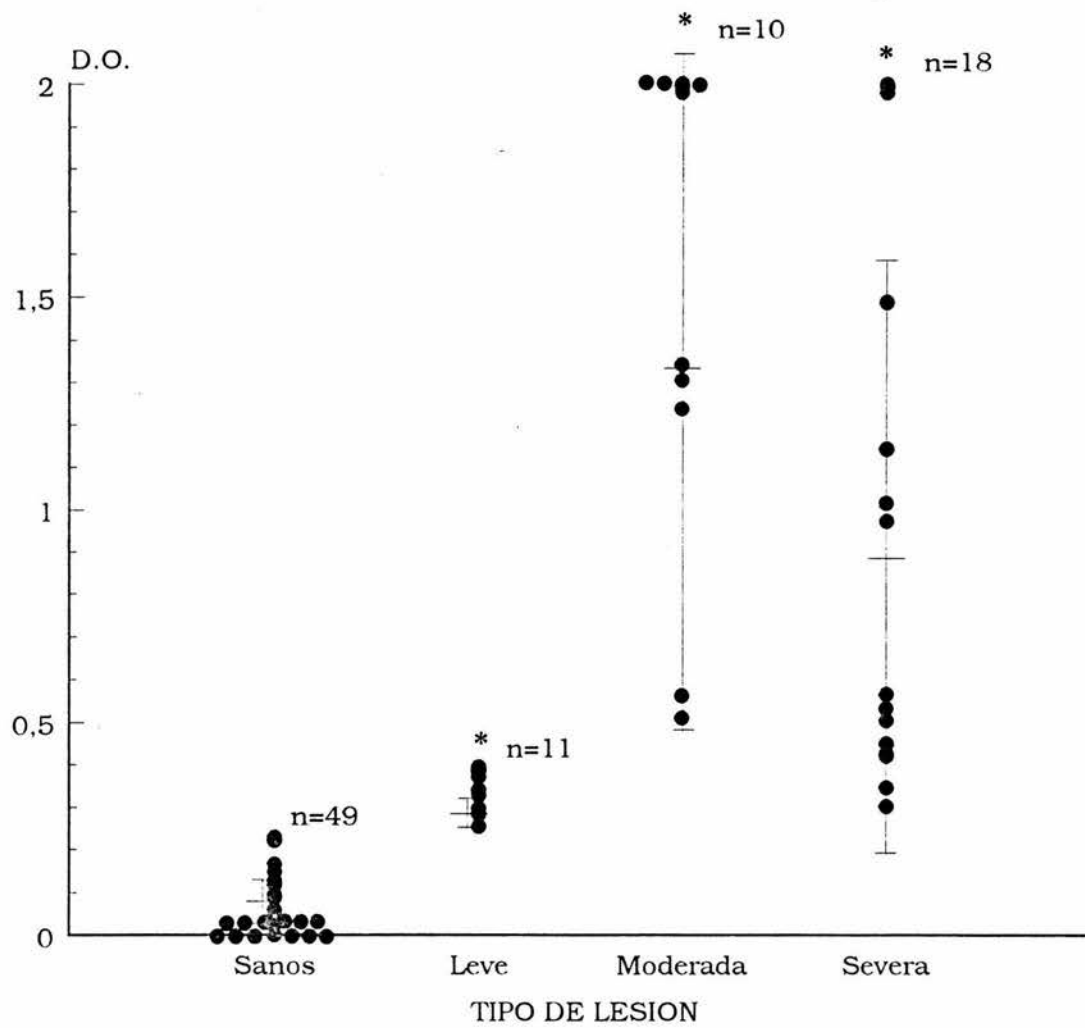


Figura 8. Respuesta de anticuerpos de sueros de *O. mykiss* hacia antígenos de la cepa I de *Saprolegnia* sp. * $p < 0.05$ para organismos infectados contra organismos sanos.

TABLA IV. Lecturas de densidad óptica de las pruebas de ELISA practicados a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando el antígeno de la cepa II de *Saprolegnia* sp

Nº org	Lesión leve	Lesión moderada	Lesión severa
1	0.210	1.516	0.848
2	0.221	1.372	1.279
3	0.296	1.383	1.341
4	0.276	0.968	0.310
5	0.238	1.415	0.284
6	0.224	1.472	1.390
7	0.255	0.984	0.908
8	0.241	0.329	0.310
9	0.191	0.379	0.227
10	1.193	1.047	0.215
11	0.259		1.736
12			0.754
13			1.333
14			0.289
15			0.374
16			1.530
17			0.399
18			0.271
Media	0.328	1.087	0.767
D. E.	0.289	0.436	0.534

D. E.: Desviación estándar

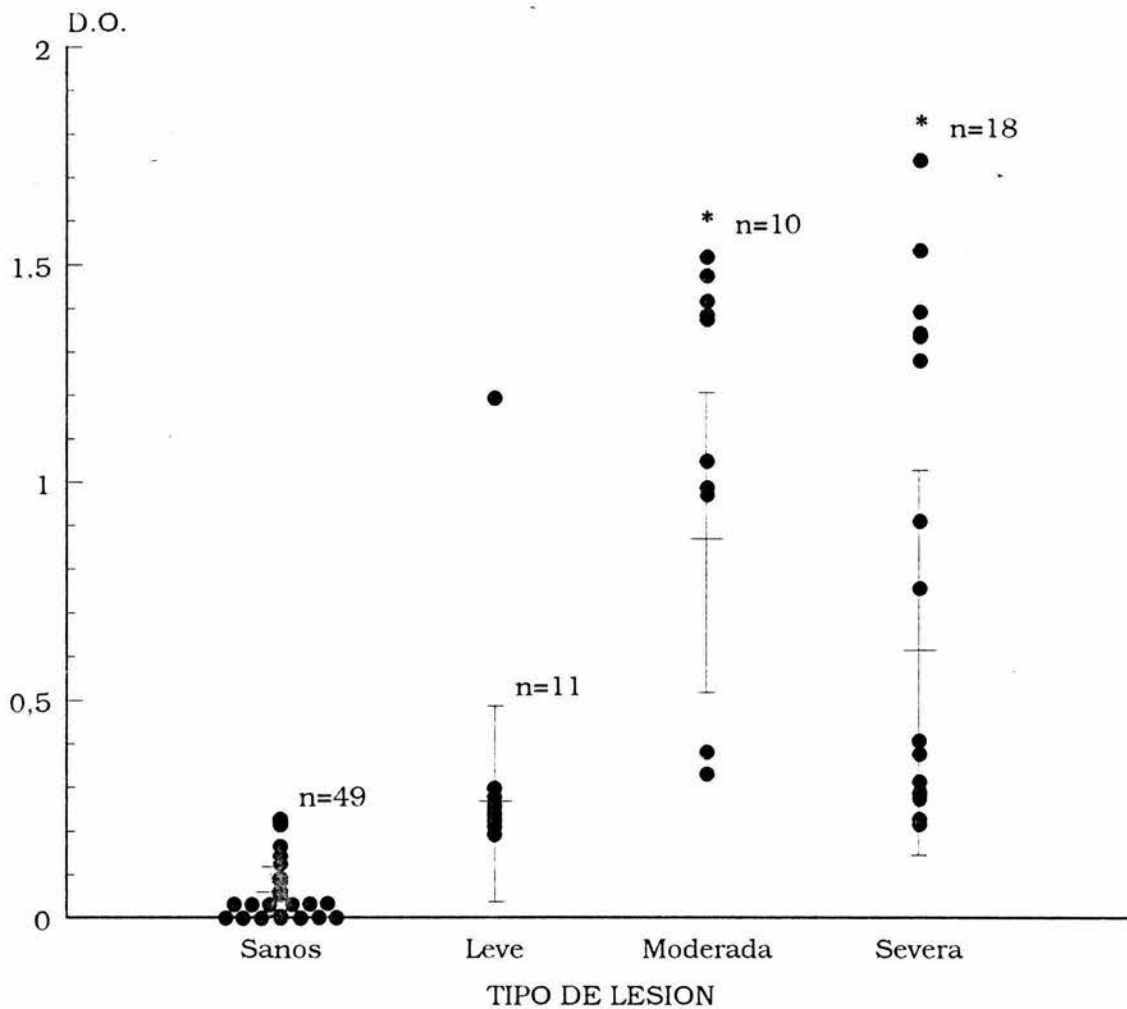


Figura 9: Respuesta de anticuerpos de *O. mykiss* hacia antígenos de la cepa II de *Saprolegnia* sp. * $p < 0.05$ para organismos infectados contra organismos sanos

TABLA V. Lecturas de densidad óptica de las pruebas de ELISA practicados a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando el antígeno de la cepa III de *Saprolegnia* sp

Nº org	Lesión leve	Lesión moderada	Lesión severa
1	0.152	1.621	0.694
2	0.205	1.413	1.366
3	0.244	1.348	1.377
4	0.300	0.611	0.264
5	0.237	1.388	0.298
6	0.184	1.445	1.474
7	0.273	0.744	0.881
8	0.245	0.267	0.313
9	0.270	0.352	0.209
10	0.232	0.751	0.184
11	0.109		1.577
12			0.758
13			1.006
14			0.367
15			0.399
16			1.401
17			0.187
18			0.275
Media	0.233	0.997	0.724
D. E.	0.056	0.500	0.517

D. E.: Desviación estándar

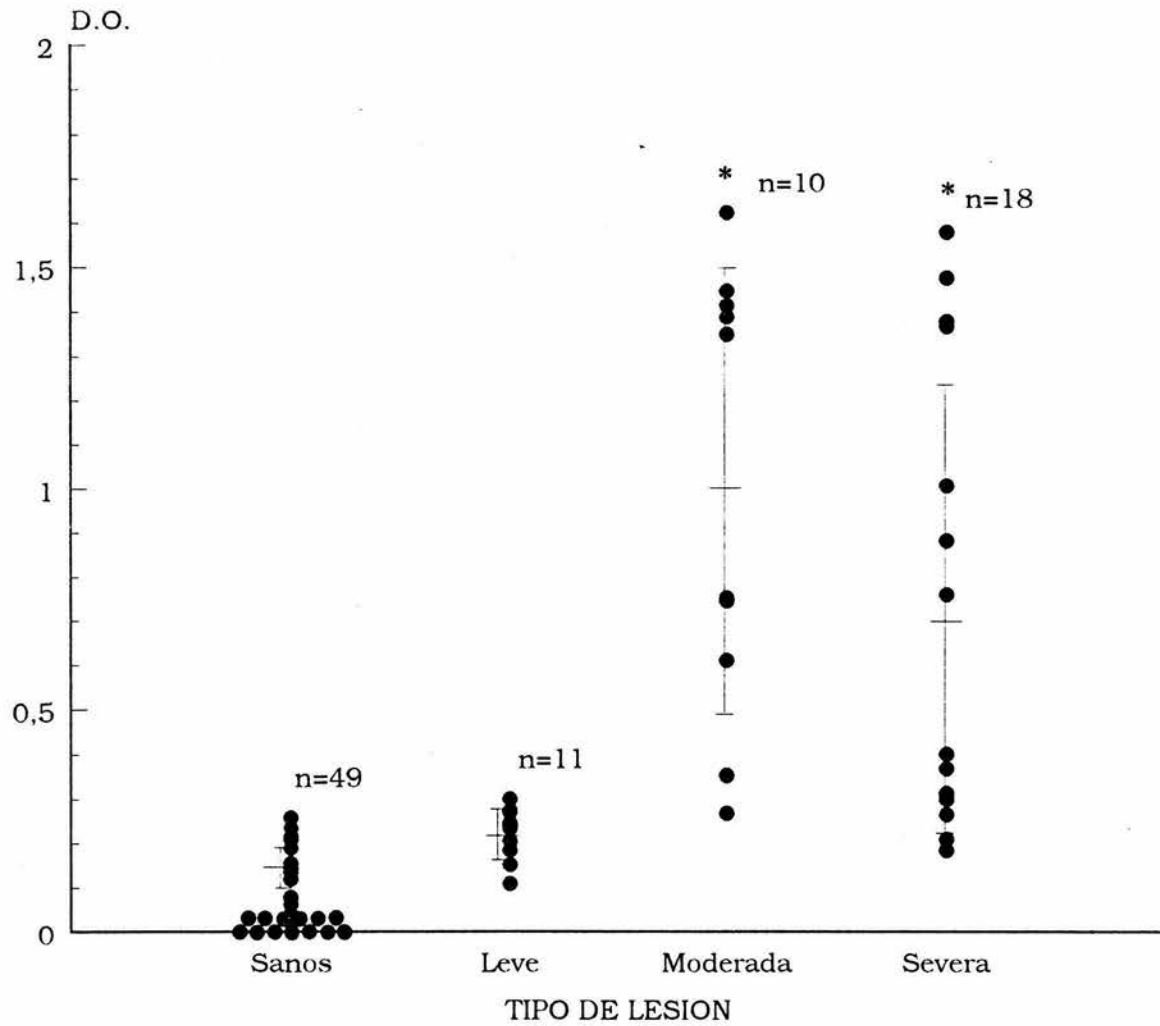


Figura 10: Respuesta de anticuerpos de *O. mykiss* hacia antígenos de la cepa III de *Saprolegnia* sp. * $p < 0.05$ para organismos infectados contra organismos sanos.

TABLA VI. Lecturas de densidad óptica de las pruebas de ELISA practicados a sueros de organismos con diferentes tipos de lesiones cutáneas, utilizando en antígeno de la cepa IV de *Saprolegnia* sp y *Mucor* sp

Nº org	Lesión leve	Lesión moderada	Lesión severa
1	0.179	1.584	0.667
2	0.248	1.439	1.324
3	0.278	1.347	1.308
4	0.284	0.663	0.286
5	0.275	1.329	0.250
6	0.218	1.509	1.434
7	0.304	0.428	0.606
8	0.271	0.227	0.341
9	0.240	0.566	0.267
10	0.287	0.744	0.262
11	0.252		1.616
12			0.991
13			1.345
14			0.460
15			0.395
16			1.117
17			0.196
18			0.244
Media	0.258	0.984	0.728
D. E.	0.036	0.507	0.503

D. E.: Desviación estándar

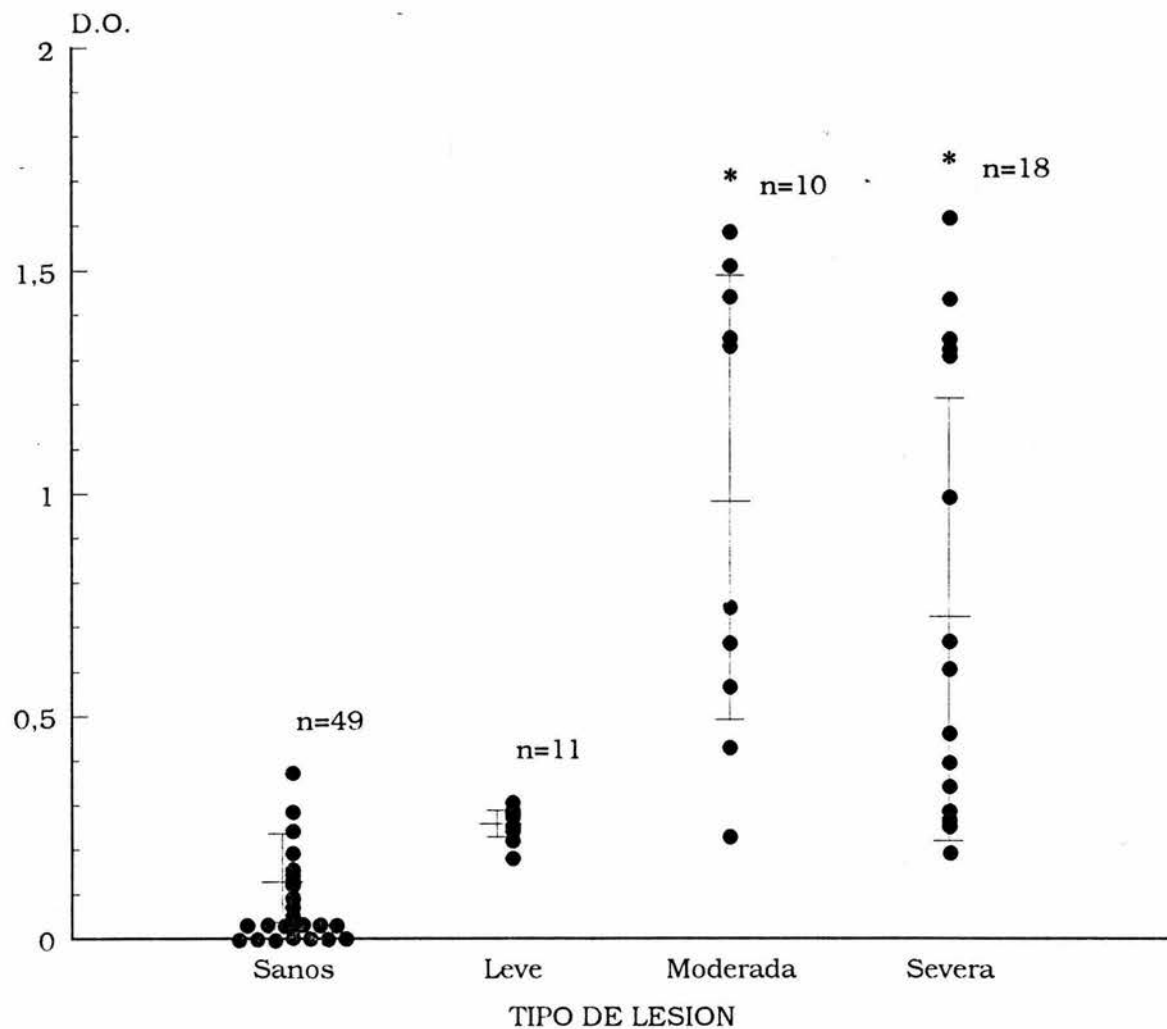


Figura 11: Respuesta de anticuerpos de *O. mykiss* hacia antígenos de la cepa IV de *Saprolegnia* sp y *Mucor* sp. * $p < 0.05$ para organismos infectados contra organismos sanos

Las respuestas mostradas por los organismos con infecciones leves, moderadas y severas mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los organismos sanos ($p < 0.05$), sin embargo, las diferencias que parecían existir en la respuesta entre organismos con lesiones moderadas y severas para la cepa I de *Saprolegnia* sp, no fueron estadísticamente significativas. Con respecto a las cepas II, III y IV (cepa mixta) existieron diferencias estadísticamente significativas entre organismos con lesiones moderadas y severas con respecto a los organismos sanos, no así entre organismos con lesiones leves y organismos sanos. Entre organismos con lesiones moderadas y severas no existieron diferencias significativas (Tablas III-VI, Figuras 8-11).

Los corrimientos electroforéticos de los diferentes antígenos mostraron diversas bandas, que se ilustran en la Fig 12. En la tabla VII se muestran los pesos moleculares de las proteínas contenidas en cada preparación antigénica

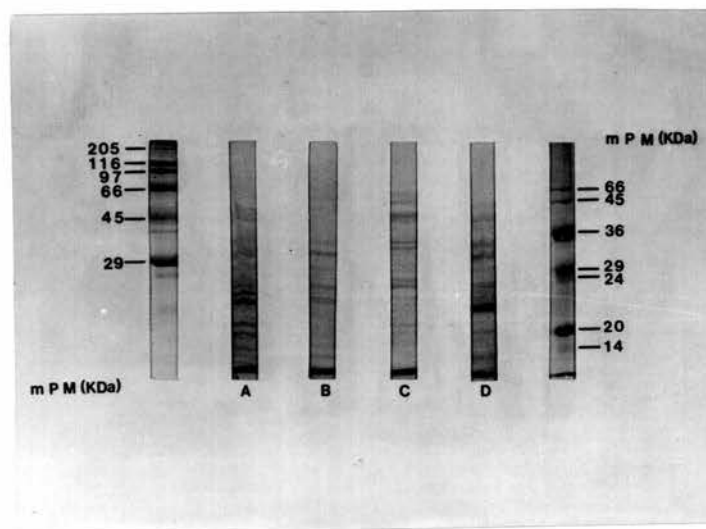


Fig 12: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 12% en condiciones reductoras y tinción con azul de Coomasie. Pérofiles de sonicados de cepas aisladas del Centro Acuícola "El Zarco". **A.** Cepa I de *Saprolegnia* sp, **B.** Cepa III de *Saprolegnia* sp. **C.** Cepa II de *Saprolegnia* sp, **D.** Cepa IV de *Saprolegnia* sp y *Mucor* sp.

Tabla VII. Pesos moleculares (expresados en KDa) obtenidos para las cepas aisladas de organismos con infecciones cutáneas Cepas I-III: *Saprolegnia* spp, Cepa IV: *Saprolegnia* sp + *Mucor* sp. El signo * marca las proteínas con PM comunes.

Cepa I	Cepa II	Cepa III	Cepa IV
63	66	45*	52
58	63	37*	45*
50	60	34	43
45*	58	28*	39
37*	52	26	37*
36	45*	17	32
31	42	13	28*
30	41	21	26
28*	37*		24
26	33		20
24	32		17
17	30		11
14	28*		
	21		
	15		
	13		
	12		

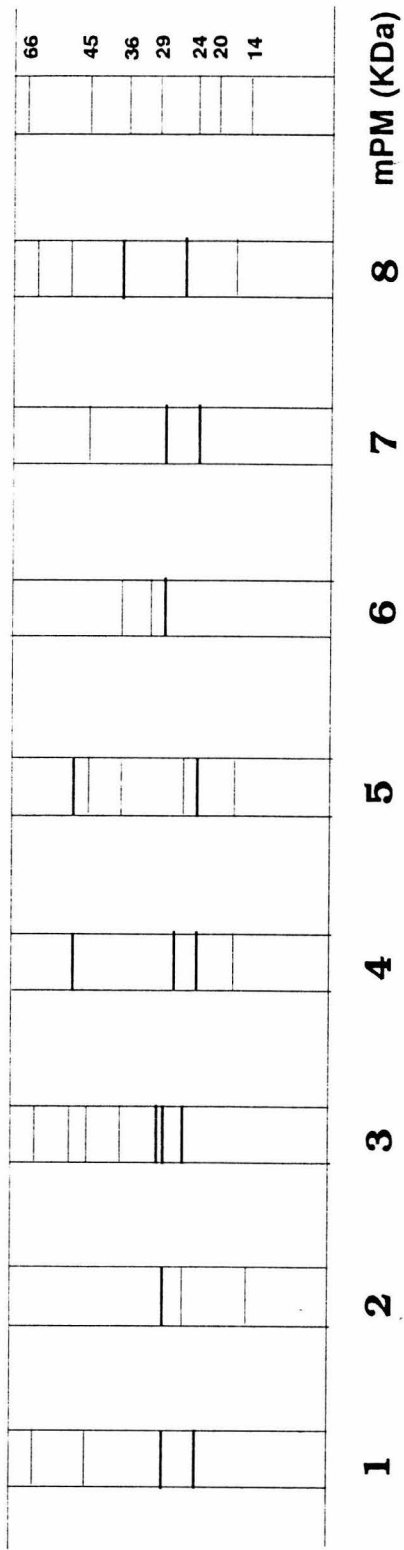
En las cepas I y II se observó una banda de PM de 58 KDa; las cepas I, II y IV mostraron una banda de PM de 26 KDa; las cepas II y III aparentemente compartieron una banda de PM de 21 KDa, las cepas I y IV compartieron una banda de PM de 24 KDa y las cepas II y IV compartieron una banda de PM de 32 KDa.

En el análisis por Western blot se revelaron las siguientes bandas de las cepas I y II de *Saprolegnia*, reveladas por 8 sueros de animales respondedores (Tabla VIII, Fig 13).

TABLA VIII. Pesos moleculares (expresados en KDa) de las proteínas reconocidas por organismos con lesiones moderadas (A) y severas (B) para las cepas I y II de *Saprolegnia* spp. El signo * marca las proteínas con PM comunes.

Cepa I				Cepa II			
58	28*	58	50	45	45	60	66
45	26	50	27	33	37	45	58
28*	17	45	24	28*	33	41	52
24		37	17	21	28*	37	45
		30				33	41
		28*				28*	37
		26					33
							30
(A)				(A)			28*
50	37*	45	58	37*	52	60	60
45	31	28	50	33	41	52	58
37*	28	24	37*	30	37*	41	52
26			26	28*	33	33	45
24			17		28*	28*	41
17							37*
							33
							30
(B)				(B)			28*

(A)



(B)

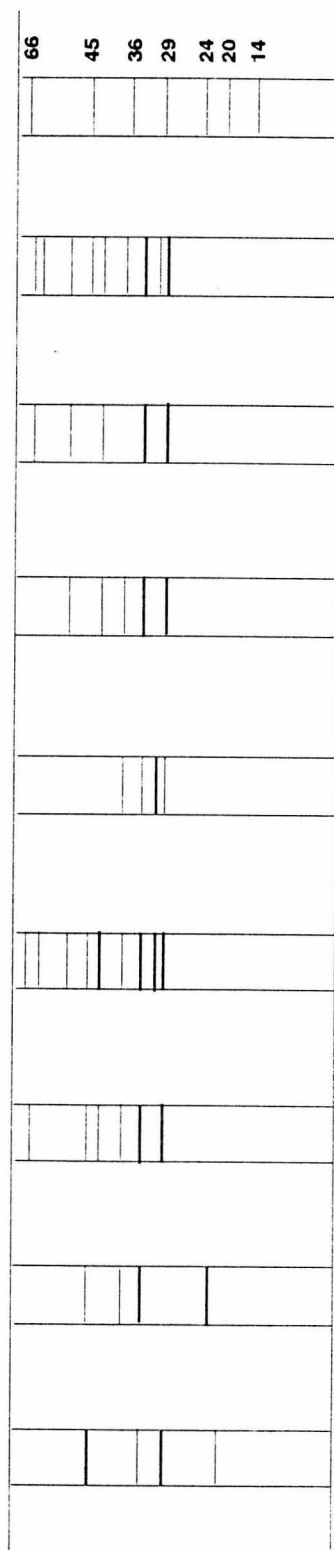


Figura 13. Analisis por Western blot del reconocimiento de las proteinas obtenidas por sonicación de la cepa I (A) y II (B) de *Saprolegnia* spp. 1-4 sueros de organismos con infecciones moderadas. 5-8 sueros de organismos con infecciones severas. **mPM:** marcadores de peso molecular.

Las proteínas más frecuentemente reconocidas por los sueros analizados (8/8) para la cepa I de *Saprolegnia* sp tienen un PM de 17 (4/8), 26 (4/8), 28 (5/8), 37 (4/8), 45 (4/8) y 50 (4/8) KDa.

Las proteínas más frecuentemente reconocidas por los sueros analizados (8 sueros) para la cepa II de *Saprolegnia* sp tienen un PM de 28 (8/8), 33 (8/8), 37 (6/8) y 45 (5/8) KDa.

Algunas proteínas con iguales PM fueron reconocidas en ambas cepas y con mayor frecuencia, por los sueros estudiados: una proteína con PM de 28 KDa, reconocida por 7 de 8 sueros; una proteína con PM de 37 KDa, reconocida por 6 de 8 sueros, y una proteína con PM de 45 KDa, reconocida por 5 de 8 sueros.

Los 4 sueros de organismos con lesiones moderadas evaluados por la técnica de Western blot reconocieron en la cepa I de *Saprolegnia* sp la proteína con PM de 28 KDa (3/4); en el caso de los sueros de organismos con lesiones severas, 3 de ellos reconocieron la proteína con PM de 37 KDa, para la cepa II de *Saprolegnia* sp las proteínas reconocidas por sueros de organismos con lesiones moderadas tuvieron PM de 45, 33 y 28 KDa; los sueros de organismos con lesiones severas reconocieron proteínas con PM de 33 y 28 KDa, 3 de ellos reconocieron proteínas con PM de 41 y 37 KDa.

DISCUSSION

DISCUSION

Los procesos infecciosos, como lo son las infecciones micóticas, son uno de los problemas más serios con que se enfrenta la industria que se dedica al cultivo intensivo de peces, ya que pueden llegar a provocar grandes pérdidas de organismos en cualquiera de sus estadios, por muerte o daño irreparable.

En el Centro Acuícola "El Zarco", como en muchos otros centros y granjas en el país, este problema representa aproximadamente el 8% de mortandad debida a infecciones micóticas (J. A. Pérez, comunicación personal); las infecciones micóticas se pueden hacer epizoóticas, lo que llega a ocasionar severos problemas en la producción.

Snieszko en 1974 (45), al estudiar las interrelaciones entre un patógeno, su hospedero y las condiciones ambientales, observó que las condiciones ambientales influyen en el comportamiento de un organismo como susceptible, y favorecen el proceso infeccioso. Además, el riesgo de contraer la infección aumenta con la presencia abundante del agente infeccioso. La estimación de la carga infecciosa es sumamente difícil, ya que frecuentemente su presencia es perceptible hasta que comienza a causar daños en la población en riesgo. Debido a la historia natural de la infección, aún cuando ésta parece estar controlada, con alguna periodicidad aparecen brotes, lo que significa que en realidad se ha mantenido un foco latente y persistente de infección, que puede manifestarse en cualquier estanque, en cualquier organismo. Este parece ser el caso particular del Centro Acuícola "El Zarco", y de varios otros (J.A. Pérez, comunicación personal).

Uno de los factores ambientales con mayor trascendencia sobre la aparición de infecciones micóticas es la temperatura (36, 43, 45). La mayoría de las epizootias se desarrollan a temperaturas bajas, aunque las infecciones consecutivas a un traumatismo se desarrollan

a cualquier temperatura. Si se considera que la temperatura que permite el crecimiento de *Saprolegnia* oscila entre 15-30°C (40), es fácil comprender que en situaciones naturales, o modificadas por el hombre, existe riesgo de infección causada por *Saprolegnia*. Pickering y Willoughby (36) reportaron en 1986 que es muy marcado el contraste entre las temperaturas que favorecen el enquistamiento, germinación y crecimiento de las especies saprófitas y de las especies patógenas del género *Saprolegnia*. De acuerdo con el estudio realizado en salmones infectados, los hongos aislados se desarrollaron durante el primer día de incubación a 10°C en agua de lagos naturales o en un medio nutritivo *in vitro* preparado con agua esterilizada proveniente de lagos. Los hongos que afectan a los organismos del C. A. "El Zarco", se desarrollan en un intervalo de 10-12°C. En el presente trabajo, los aislados crecieron en el laboratorio a temperatura ambiente y para su identificación se crecieron a dos temperaturas: a 4 y 30°C. Waterhouse (citado en 21) en 1942 mencionó que en otoño y en invierno es más frecuente lograr el aislamiento de *Saprolegnia* en ríos y lagos de agua dulce. En el caso de los salmones, el *stress* reproductivo y el desequilibrio fisiológico transitorio causado durante el desove, los convierte en candidatos para contraer la infección de forma casi inmediata (43). Muchos investigadores han señalado que frecuentemente en las épocas de frío se intensifican las infecciones por hongos en los salmones (citados en 21), aparentemente porque la temperatura del agua es propicia para la formación y crecimiento de las formas infectivas del hongo.

En 1930, ya se reportaba que en animales poiquiloterms la respuesta inmune es sensible a la temperatura. A bajas temperaturas, algunos investigadores reportan la reducción en el título de anticuerpos. Otros reportan una supresión completa, o bien solamente un retardo en el tiempo de aparición de los anticuerpos con o sin supresión. También se han reportado los diferentes estados en los mecanismos celulares que son más o menos sensitivos a la temperatura, como la interacción entre linfocitos B y T, y la síntesis y liberación de anticuerpos. Después del evento de cooperación celular, la respuesta parece

no afectarse por temperaturas bajas (46).

Por otro lado, la temperatura parece actuar negativamente de forma indirecta sobre los mecanismos de defensa inmunológica de los peces a través de factores humorales. Las temperaturas altas podrían reducir la cantidad de transcortina (proteína transportadora de corticoesteroides) ligada a corticoesteroides en el plasma del pez, los cuales causan cambios metabólicos que contribuyen a la reducción significativa de la respuesta inmune y al incremento de la susceptibilidad hacia la infección específica por *Saprolegnia* (43).

En el caso de la trucha arcoiris, es notable el hecho de que al parecer también se vuelve altamente susceptible a la infección por hongos en su etapa reproductora, la cual coincide con la época del año en que la temperatura ambiental, y por tanto la del agua, es más baja. La maduración sexual en machos de la trucha café se encuentra asociada con la desmudificación epidérmica (36), lo que aparentemente favorece más al desarrollo de la infección fúngica en los machos que en las hembras sexualmente maduras (36). Otros autores han acumulado mayor evidencia de que la susceptibilidad hacia infecciones ectoparasitarias está fuertemente influida por el sexo del animal (35). Es también improbable que el incremento de la vulnerabilidad hacia ectoparásitos de piel pueda ser explicada simplemente en términos de la demanda física de los peces en el periodo de desove. Paling (citado en 36) en 1965 observó la incidencia y la severidad de la infección en las branquias de la trucha café en Windermere por *Discocotyle sagittata* Leuckart que fue significativamente más severa en machos maduros en la época del desove.

Roth (43) en 1942 demostró una clara relación entre los niveles aumentados de algunas hormonas y la incidencia de infecciones micóticas, y se sugirió la relación con la disminución de la formación de anticuerpos y la supresión de la reacción inflamatoria. Se señaló que algunos tipos de *stress* fisiológico sumado a las bajas temperaturas, podrían

favorecer aún más la capacidad y velocidad de crecimiento de los hongos, así como la existencia de un vínculo directo entre el incremento de los niveles de corticoesteroides en el plasma, inducido por *stress*, y la susceptibilidad de los peces a infecciones causadas por *Saprolegnia*. Se ha demostrado que las hembras son más susceptibles a desarrollar éste tipo de infección (36, 43).

Factores que favorecen las infecciones micóticas en peces, y que parecen actuar de manera muy precisa durante el desarrollo de la infección en la trucha arcoiris: a) el mayor número de nuevos casos se encuentra durante los meses de Octubre a Febrero, que son los meses en donde la temperatura del agua desciende en hasta un intervalo aproximado de 10 a 12°C; b) ésta es la época de desove de los organismos, donde se da la madurez sexual, la cual conlleva a un *stress* de tipo hormonal; c) la manipulación de los organismos por parte de los trabajadores de las granjas y los centros acuícolas, en muchas ocasiones causan traumatismos en los peces (*stress* físico), que se convierten en vías de entrada potenciales para patógenos.

Dentro del C. A. "El Zarco" se ha tratado de implementar una nueva forma de llevar a cabo los desoves, ya que este es un factor que parece predisponer a los organismos hacia las infecciones micóticas. Antiguamente todos los organismos reproductores eran llevados a una sala destinada para los desoves, esto implicaba varios eventos: 1) los organismos eran redeados para verificar si eran candidatos para desovar; 2) los organismos elegidos eran transportados del sistema de estanquería hasta la sala de desove en cubetas u ollas en carretillas; 3) cada organismo era manejado por más de un trabajador. Todo esto implicaba un *stress* muy fuerte para los organismos a nivel físico, además de los accidentes esporádicos que se presentaban. Una forma de prevenir las infecciones será mejorar las técnicas de manipulación de los organismos, de tal manera que se eviten traumatismos que conlleven a pérdidas en la continuidad de la piel, y a un *stress* severo.

En la mayoría de las ocasiones, es difícil obtener cepas puras a partir de raspados o improntas de la piel del organismo infectado; en otras ocasiones, se encuentran más de una especie de hongo en los cultivos. Además, la identificación del género, y, sobre todo, la identificación de la especie (36), no es muy fácil, ya que para la identificación de la especie, es necesario el estudio microscópico de estructuras sexuales, tales como la oogonia y el anteridio, que sólo se inducen *in vitro* haciendo crecer al hongo sobre semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*) (36, 40). Paradójicamente, este tipo de estructuras se forman muy fácilmente en el pez infectado, y es, de hecho, la forma de diseminación de la infección. La identificación se complica aún más cuando se trata de aislar el hongo a partir de lesiones, ya que existen hongos saprófitos capaces de crecer en tejido necrótico, lo que en ocasiones deja la duda sobre su papel como patógeno primario, o que no desarrolle una enfermedad por ella misma sino como consecuencia del debilitamiento u otras enfermedades (36). Algunos autores han sugerido que *Saprolegnia* sea sólo un saprófito, o cuando mucho un patógeno oportunista (36). Por desgracia, con frecuencia se comete el error de dar por hecho que todas las infecciones micóticas son causadas por *Saprolegnia*, sin que medie la identificación del agente etiológico, dadas las inconveniencias mencionadas. Esta situación ha contribuido al desconocimiento de la situación real y por lo tanto a la inexistencia de medidas de erradicación y control .

En el presente trabajo, las cepas aisladas de los organismos del Centro Acuícola "El Zarco", fueron identificadas solamente hasta género. Destaca el hecho de que casi en la totalidad de los casos, crecieron cepas puras, sin mezclas de especies.

El hongo invade más comúnmente de forma primaria las aletas y posteriormente el resto del cuerpo. Dos estudios independientes en la maduración de la trucha café han demostrado una clara preferencia sexual en el patrón de infección de *Saprolegnia* (36). Existen diferencias en el patrón de infección en truchas de vida libre y en truchas

cultivadas; los peces cultivados se infectan más frecuentemente en las aletas que en el resto del cuerpo, en ambos sexos. En peces de vida libre, se ha encontrado que los machos son más vulnerables a lo largo de la superficie dorsal, en tanto que las hembras son más vulnerables en la región caudal y anal (36). En el presente trabajo, la mayoría de los organismos muestreados presentaron infección diseminada en casi todo su cuerpo. Los organismos con lesiones de tipo leve se caracterizaron por presentar lesiones principalmente en la aleta caudal y la aleta dorsal, aunque no se llevó a cabo el registro de la proporción de machos y hembras que presentaban lesiones, es posible marcar que más del 70% de los animales muestreados fueron hembras.

Uno de los mecanismos de defensa contra infecciones cutáneas es la secreción de moco en piel, la cual podría ser una barrera inicial de resistencia a la invasión de agentes patógenos (24, 36). Algunos trabajos realizados por Willoughby (1971), Willoughby y Pickering (1977) y Willoughby y col (1982) (citados en 36) demostraron que el moco epidérmico de peces salmónidos, es un excelente medio de crecimiento para las esporas de *Saprolegnia diclina* Tipo I. Aunque estos resultados son contradictorios, es muy posible que el moco sea realmente mediador de un mecanismo de protección en piel, como lo es en las mucosas.

Cuando ocurren pequeñas abrasiones en la epidermis, éstas se cubren rápidamente por secreciones mucosas y por células epidérmicas (36), pero las heridas muy grandes son sitios potenciales para la colonización por *Saprolegnia*. Es probable que el incremento en la susceptibilidad de las aletas de la trucha café hacia infecciones por *Saprolegnia* sea parcialmente el resultado del daño mecánico en sitios con altas densidades de población.

Por otro lado, existe una infiltración temprana de células parecidas a los linfocitos hacia los sitios de infección de *Saprolegnia* en la epidermis de la trucha café, lo que podría sugerir

una respuesta inmune local (36). Hodkinson y Hunter (24) en 1970 detectaron anticuerpos precipitantes en el suero del salmón del Atlántico *Salmo salar* hacia antígenos de *Saprolegnia*, pero la reactividad cruzada que existe entre las especies de *Saprolegnia* y diversos antígenos microbianos, impiden declarar en la actualidad de forma tajante que la prueba utilizada por Hodkinson y Hunter (1970) sea útil para confirmar que realmente *Saprolegnia* induce la formación de anticuerpos séricos específicos (36).

[La prueba de ELISA utilizada en el presente trabajo, permitió establecer que solamente los organismos que mostraban lesiones originadas por *Saprolegnia* respondían hacia los antígenos preparados a partir de las cepas que fueron aisladas directamente de los organismos infectados. Una observación muy importante fue el hecho de que los organismos que no mostraban lesiones aparentes, no mostraron respuesta de anticuerpos hacia ninguna de las preparaciones antigénicas utilizadas. Sin embargo, los sueros de peces que respondieron positivamente a los antígenos utilizados fueron trabajados a una dilución muy pequeña (1:25) debido básicamente al bajo título del anticuerpo comercial anti-Ig de trucha acoplado a peroxidasa. Estudios como el que aquí se plantea, requieren de la accesibilidad de los biológicos adecuados. Esta es un área para un potencial desarrollo tecnológico. Por otro lado, los resultados sugieren un valor potencial como un probable sistema de diagnóstico serológico de infecciones causadas por *Saprolegnia*. El sistema de ELISA ha demostrado ser una herramienta importante en el diagnóstico de algunas enfermedades víricas y bacterianas (3, 4, 6, 8), aunque presenta los mismos inconvenientes de cualquier otro método de diagnóstico serológico. Sin embargo, la mayor factibilidad de hallar anticuerpos que el parásito, mantienen a los métodos serológicos como herramienta de elección sobre los métodos bacteriológicos o parasitológicos.

Con los resultados obtenidos con el sistema de ELISA, como fue empleado, se detectó a organismos con infecciones moderadas y severas, los cuales en dichas condiciones ya eran

muy evidentes. En este caso, se podría ampliar el estudio tratando de hacer un diagnóstico diferencial de las micosis tegumentarias. Pero además, el sistema aquí propuesto, adecuadamente modificado, deberá ser útil para la detección de las infecciones tempranas, ya que en tales casos, es más probable recuperar a los animales enfermos. En estadios avanzados el proceso es prácticamente irreversible, por lo que su detección, además de obvia resulta ya inútil.

El análisis de los componentes proteicos de las mezclas antigénicas por inmunoelectroforesis demostró que cada cepa estudiada tenía una composición de proteínas diferente, si bien algunas proteínas parecían ser comunes, al menos en su peso molecular, todas las cepas compartieron proteínas de 45, 37 y 28 KDa. En cuanto a su antigenicidad, estudiada por *Western blot*, se observó que se reconocen diferentes bandas en las cepas I y II, aunque también algunas parecen compartirse. Las proteínas más frecuentemente reconocidas por los sueros son las siguientes: una de 28 KDa (7 de 8 sueros), una de 37 KDa (6 de 8 sueros) y una de 45 KDa (5 de 8 sueros). Este hecho es muy relevante, y debido a la frecuencia con que fueron reconocidas dichas proteínas, sería interesante investigar su posible papel en la inmunidad o la patogenia de la enfermedad.

En el sistema empleado de *Western blot* el color desarrollado no pudo ser estabilizado, aunque el bandeo fue definido y visible, la permanencia de las bandas fue inestable.

Los estudios realizados en otros campos han demostrado que no existe exclusividad de las proteínas encontradas en un microorganismo en particular. Algunos componentes de microorganismos son más o menos ubicuos, en tanto que otros parecen estar restringidos a unos cuantos géneros o especies (2). Esta situación podría ser aprovechada para lograr dos objetivos fundamentales, al menos en el caso de las saprolegniasis: las proteínas comunes a cada cepa o especie son una herramienta valiosa para el desarrollo de métodos

de diagnóstico inmunológico; la exclusividad de algunas otras proteínas, podría ser aprovechada para la clasificación e identificación de las diferentes especies. Este par de objetivos elimina la necesidad del cultivo e identificación, con los muchos inconvenientes mencionados.

Sin embargo, es necesario el plantear programas dirigidos al personal que labora dentro de cualquier Centro o granja acuícola , para capacitar a los trabajadores en el trato que se da a los organismos y reconocer oportunamente cualquier tipo de infección y cuáles serían los pasos a seguir, indicando nuevamente que no basta tan sólo con aislar a los organismos infectados o sacrificarlos, ya que simplemente lo que hacemos es continuar favoreciendo los focos de infección sin dar una solución definitiva. Si lográramos programas eficaces de sanidad piscícola, cooperación entre centros de investigación y Centros Acuícolas, en conjunción con sus trabajadores, podríamos aumentar la calidad de producción de los organismos dentro de la Acuicultura y evitaríamos la propagación de infecciones en un futuro.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1. Las cepas de hongos aisladas del Centro Acuícola "El Zarco" pertenecen al género *Saprolegnia*, aunque se desconoce si son patógenos o saprófitos.
2. Las cepas recuperadas separadamente pertenecen a diferentes especies.
3. La respuesta de anticuerpos permite diferenciar animales sanos de animales infectados.
4. El corrimiento electroforético demostró que cada cepa posee una composición de proteínas diferente, aunque son compartidas por todas las cepas las proteínas con un PM de 45, 37 y 28 KDa.
5. Las proteínas más frecuentemente reconocidas por las cepas I y II tienen un PM de 45, 37 y 28 KDa.
6. La proteína más frecuentemente reconocida por los sueros analizados para la cepa I de *Saprolegnia* sp tiene un PM de 28 KDa.
7. Las proteínas más frecuentemente reconocidas por los sueros analizados para la cepa II de *Saprolegnia* sp tienen un PM de 28, 33, 37, 41 y 45 KDa.
8. La proteína que más reconocen los organismos con lesiones moderadas para la cepa I de *Saprolegnia* sp tiene un PM 28 KDa y para la cepa II de *Saprolegnia* sp es de 45 KDa.

9. La proteína que más reconocen los organismos con lesiones severas para la cepa I y II de *Saprolegnia* sp tiene un PM de 37 KDa.

10. Los sistemas de estudio empleados ofrecen la posibilidad de desarrollar un método de diagnóstico inmunológico y de estudios taxonómicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) Acton, R.T.; P.F. Weinheimer; S.J. Hall; W. Niedermeier; E. Shelton y J.C. Bennett (1971) Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **68**: 107-111.
- (2) Adams, A., A. Bundy, K. Thompson y M.T. Horne. (1988) The association between virulence and cell surface characteristics of *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* **69**: 1-14.
- (3) Adams, A. (1991) Detection of *Vibrio parahaemolyticus* biotype *alginoliticus* in panaeid shrimp using an amplified enzymelinked immunosorbent assay. *Aquaculture* **93**: 101-108.
- (4) Adams, A. (1992). Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect and quantify bacterial pathogens in fish tissue. *Techniques in fish immunology*. SOS Publications. USA. pp 196.
- (5) Alexopoulos, C.J. y C.W. Mims (1985) *Introducción a la Micología*. Ed. Omega. Barcelona, España. pp 638.
- (6) Austin, B., L. Bishop, C. Gray, B. Watt y J. Dawes (1986) Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric red mouth and furunculosis in fish farms. *J. Fish Dis.* **9**: 469-474.

- (7) Bailey, T.A., K. Bradford y C.E. Bland (1990) Induction of sporulation and the influence of time, temperature, and inoculum size on growth in two species of aquatic fungi (Saprolegniales). *J Elisha Mitchell Scientific Society*. **106**: 57-63.
- (8) Bortz, B.M., G.E. Kenny, G.B. Pauley, E. García-Ortigoza y D.P. Anderson (1984) The immune response in immunized and naturally infected Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to *Diplostomum spathaceum* as detected by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Dev Comp. Immunol.* **8**, 813-822.
- (9) Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- (10) Campbell, D.H.; J.S. Garvey; N.E. Cremer y D.H. Sussdorf (1970) *Methods in Immunology. A Laboratory Text for Instruction and Research*. Second Edition. W.A. Benjamin, Inc. New York. pp 454.
- (11) Cone, R.E. y J.J. Marchalonis (1972) Cellular and humoral aspects of the influence of environmental temperature on the immune response of poikilothermic vertebrates. *J. Immunol.* **108**: 952-957.
- (12) Cuchens, M.A. y L.W. Clem (1977) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cellular Immunol.* **34**: 219-230.
- (13) Dehai, X. y W. A. Rogers (1991) Electron microscopy of infection by *Saprolegnia* spp. in channel catfish. *J Aquatic Animal Health.* **3**: 63-69.

- (14) Di Conza, J.J. y W.J. Holliday (1971) Relationship of catfish serum antibodies to immunoglobulin in mucus secretions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **49**: 517-519.
- (15) Ghittino, P. (1976) *Advances in Aquaculture. Papers presented at the FAO Technical Conference on Aquaculture.* Kyoto, Japan (26 May - 2 June). Fishing News Books LTD. Farnham. Surrey. England. pp 651.
- (16) Graves, S.S.; D.L. Evans y D.L. Dawe (1985) Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Immunol.* **134**: 78-85.
- (17) Gregorio, C. (1995) Proyecto Aquila II. *FAO Aquaculture Newsletter, FAN.* **5**: 8-11.
- (18) Hadji- Azimi, Y. y M. Michea-Hamzahpour (1976) *Xenopus leavis* 19S immunoglobulin, ultrastructures and J chain isolation. *Immunology.* **30**: 587-591.
- (19) Hayman, J.R. y C.J. Lobb (1993) Immunoglobulin in the eggs of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 241-248.
- (20) Hodgins, H. O.; R.S. Weiser y G.J. Ridgway (1967) The nature of antibodies and the immune response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Immunol.* **99**: 534-544.

- (21) Hodgkinson, M. y A. Hunter (1970) Immune response of U.D.N.-infected salmon to *Saprolegnia*. *J. Fish Biol.* **2**: 305-311.
- (22) Hirotooshi, F.; A. Hara; F. Yamazaki y K. Kobayashi (1992) A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 415-423.
- (23) Houghton, G., L. J. Healey y T. (R.A.) Matthews (1992) The cellular proliferative responses, humoral antibody response, and cross reactivity studies of *Tetrahymena pyriformes* with *Ichthyophthirius multifiliis* in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 301-312.
- (24) Ingram, G.A. (1980) Substances involved in the natural resistance of fish to infection- A review. *J. Fish Biol.* **16**: 23-60.
- (25) Jiménez, G.F., L.S. Galviz, F.S. Segovia, y H.F. Garza. *Sanidad Acuicola*. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Fideicomiso Fondo Nacional para El Desarrollo Pesquero.
- (26) Kobayashi, K.; S. Tomonaga y T. Kajii (1984) A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of cartilaginous fish, the skate, *Raja kenoyei*: isolation and characterization. *Molecular Immunol.* **21**: 397-404.
- (27) Kobayashi, K.; S. Tomanaga y S. Tanaha (1992) Identification of a second immunoglobulin in the most primitive shark, the frill shark, *Chlamydoselachus anguineus*. *Dev Comp Immunol.* **16**: 295-299.

- (28) Ling, K.H.; Y.M. Sin y T.J. Lam (1993) Protection of goldfish against some common ectoparasitic protozoans using *Ichthyophthirius multifiliis* and *Tetrahymena pyriformis* for vaccination. *Aquaculture* **116**: 303-314.
- (29) Marchalonis, J.J. (1971) Isolation and partial characterization of immunoglobulins of goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology* **20**: 161-173.
- (30) Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud (1983) *Diagnóstico de la salud animal de las Américas*. Publicación científica N° 452. pp 282.
- (31) Ourth, D.D. (1980) Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Dev. comp. Immunol.* **4**: 65-74.
- (32) Pérez, S. L.A. y A. Auro (1989) *Enfermedades de importancia en piscicultura comercial. (Epizootiología*diagnóstico*tratamiento*control)*. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia. México, D.F. pp 155.
- (33) Pettey, C.L. y E.C. McKinney (1988) Induction of cell-mediated cytotoxicity by shark 19s IgM. *Cellular Immunology.* **111**: 28-38.
- (34) Pickering, A.D. (1974) The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Fish Biol.* **6**: 111-118.

- (35) Pickering, A.D. y P. Christie (1980) Sexual differences in the incidence and severity of ectoparasitic infestation of the brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.* **16**: 669-683.
- (36) Pickering, A.D. y L.G. Willoughby (1986) *Saprolegnia* infections of salmonid fish en Roberts, R.J. Microbial diseases of fish. Published for the Society of General Microbiology by Academic Press, London (U.K.) and U.S., 2nd edition. pp 305.
- (37) Raison, R.L.; C.J. Hull y W.H. Hildemann (1978) Characterization of immunoglobulin from the Pacific hagfish, a primitive vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 5679-5682.
- (38) Rickers, G.T. (1981) Introduction of fish immunology. *Dev. Comp. Immunol.* **5**: 527-534.
- (39) Rickers, G.T., E. M. H. Frederix-Wolters y W.B. van Muiswinkel (1980) The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology.* **41**: 91-97.
- (40) Roberts, R.J. (1981) *Patología de los peces*. Ediciones Mundi-Presa. España. pp 369.
- (41) Rombout, J.H.W.M., N. Taverne, M. van de Kamp y A. J. Taverne-Thiele (1993) Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Ciprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 309-317.

- (42) Roit, I ; J. Brostoff y D. Male (1993) *Immunology*. Third Edition. Ed. Consultant. Mosby. London, England. pp 408.
- (43) Roth. R.R. (1972) Some factors contributing to the development of fungus infection in freshwater fish. *J. Wildlife Diseases*. **8**: 24-27.
- (44) Santacana, J. (1989) *Reunión Técnica de Planificación en Acuicultura*. Caracas, Venezuela (8-12 Mayo, 1989). Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia. (Documento preparado para el Proyecto GCP/RLA/075/ITA apoyo a las actividades regionales de acuicultura para América Latina y Caribe). Organización para las N.U. para la Agricultura y Alimentación. Brasilia, Brazil. pp 219.
- (45) Sniesko. S.F. (1974) The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol*. **6**: 197-208.
- (46) Stolen, J. S., T. Gahn, V. Kasper y J. J. Nagle (1984). The effect of environmental temperature on the immune response of a marine teleost (*Paralichthys dentatus*). *Dev. Comp. Immunol*. **8**: 89-98.
- (47) St. Louis-Cormier, E.A., C.K. Osterland y P. D. Anderson (1984) Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *De. Comp. Immunol*. **8**: 71-80.
- (48) Van Houtte A. (1994) The legal regime of Aquaculture. *FAO Aquaculture Newsletter, FAN*. **7**: 10-15.