

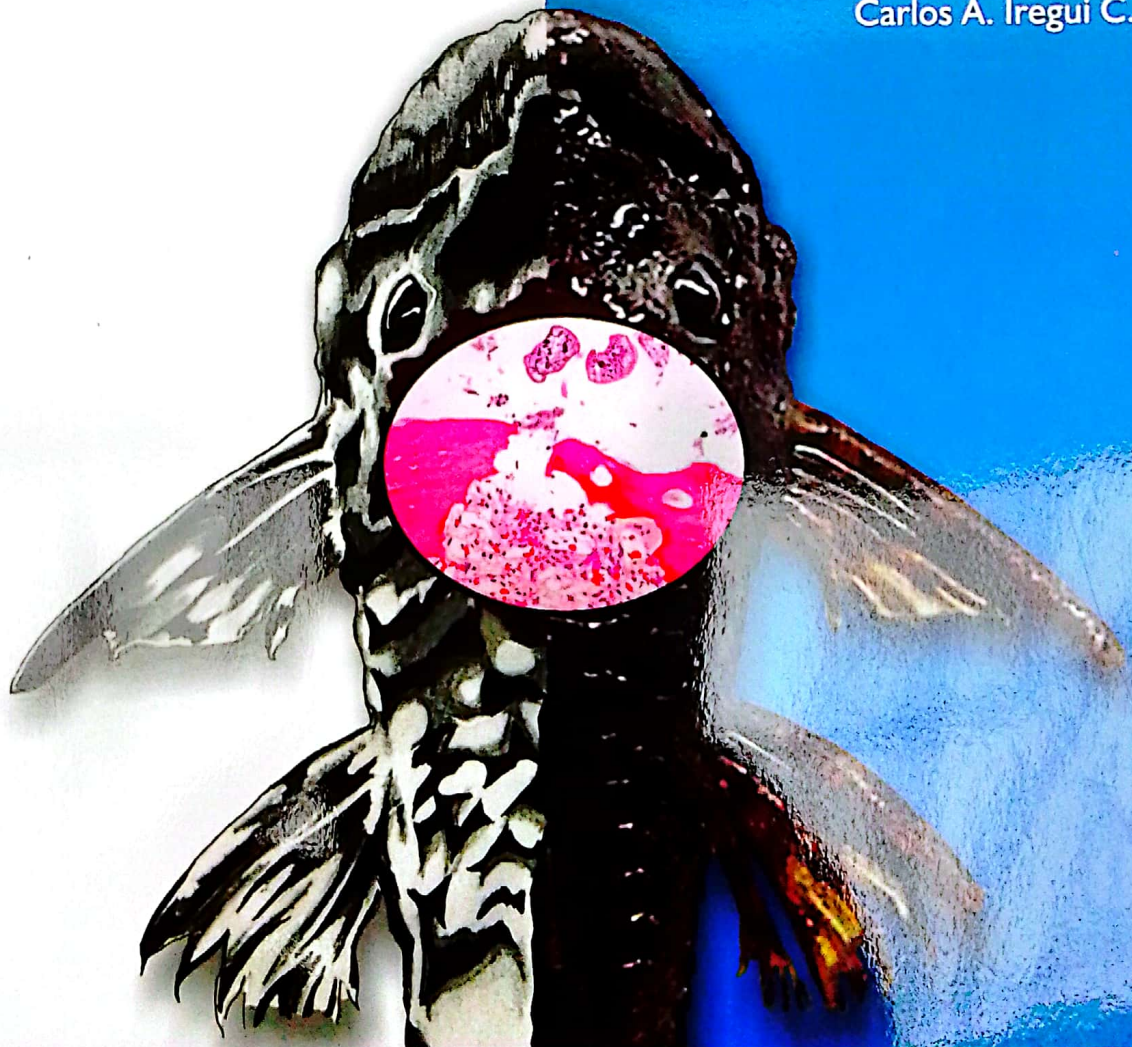


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
GRUPO DE PATOBIOLOGÍA VETERINARIA

Manual de toma y procesamiento de muestras de peces ornamentales

Giovanny Penagos C.
Paola A. Barato G.
Judith Figueroa R.
Liz Andrea Sánchez
Víctor Manuel Tibatá
Carlos A. Iregui C.



Manual de toma y procesamiento de muestras de peces ornamentales

Giovanny Penagos Castro, MV, cMSc

Paola Barato Gómez, MV, Esp., cPhD

Judith Figueroa Ramírez, Microbióloga, MSc

Liz Andrea Sánchez A., MVZ

Víctor Manuel Tibatá, MV, MSc

Carlos Iregui Castro, DMV, Esp., DVM



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
GRUPO DE PATOBIOLOGÍA VETERINARIA

Bogotá, D. C., septiembre de 2012

- © Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
- © Giovanni Penagos Castro
Paola Barato Gómez
Judith Figueroa Ramírez
Liz Andrea Sánchez A.
Victor Manuel Tibatá
Carlos Iregui Castro

PORTADA

Ángela Pilone Herrera

ILUSTRACIONES

Julian Vásquez M.

ISBN 978-958-761-246-2

Primera edición, 2012

IMPRESIÓN:

Editorial Universidad Nacional de Colombia
www.editorial.unal.edu.co
direditorial@unal.edu.co

Bogotá, D.C., Colombia

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales

Impreso y hecho en Bogotá, D. C., Colombia

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Manual de toma y procesamiento de muestras de peces ornamentales / Giovanni
Penagos Castro ... [et al.]. – Bogotá : Universidad Nacional de Colombia. Facultad
de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Grupo de Patobiología Veterinaria, 2012
24 p., il.

Incluye referencias bibliográficas

ISBN : 978-958-761-246-2

Peces ornamentales – Colombia 2. Peces - Enfermedades 3. Infecciones en los
peces 4. Microbiología veterinaria I. Penagos Castro, Giovanni, 1976-

CDD-21 639.34 / 2012

CONTENIDO

Introducción	6
Generalidades	7
Envío de las muestras	8
Animales vivos	8
Animales fijados en formalina	9
Necropsia y toma de muestras para patología	9
Instrumental y materiales	9
Procedimiento	10
Toma y envío de muestras para diagnóstico microbiológico convencional	14
Instrumental y materiales	14
Procedimiento	15
Características básicas de las bacterias	17
Identificación molecular	17
Toma y envío de muestras para diagnóstico de micobacterias no tuberculosas (MNT)	19
Instrumental y materiales	19
Procedimiento	20
Características básicas de las MNT	21
Identificación molecular	22
Bibliografía	24

INTRODUCCIÓN

Esta cartilla, junto con su similar "Manual de estrategias de prevención y control de enfermedades en peces ornamentales" y el libro "Mapa epidemiológico de las enfermedades de los peces ornamentales en Colombia" son resultados comunes del proyecto "Construcción del primer mapa epidemiológico de las enfermedades de los peces ornamentales en Colombia" MADR-057-2007U4448-387-07.

Los protocolos y recomendaciones en los procesamientos se fundamentan en los resultados consignados en el libro. Se describen los aspectos sobresalientes de las técnicas que sirven para diagnosticar el mayor porcentaje de enfermedades. Algunas otras, por ejemplo las de tipo toxicológico, nutricional o de clasificación fenotípica de parásitos requieren el uso de laboratorios específicos y procedimientos difíciles de aplicar en las actuales condiciones de la cadena de comercialización de peces de acuario y deberán ser abordados en su momento, seguramente en granjas de cultivo.

Toda la información y eficiencia diagnóstica que el laboratorio puede proporcionar, depende de la calidad de las muestras recibidas y la historia remitida. Una muestra mal tomada o mal transportada reduce las posibilidades de diagnóstico y de control de los problemas; además significa pérdida de tiempo y dinero.

La evaluación conjunta de órganos (macroscópica) y tejidos (microscópica) es la herramienta fundamental en el diagnóstico de enfermedades en peces. Debido entre otras cosas al tamaño y al valor de la mayoría de los ejemplares, es posible tomar un buen número de individuos y analizar todos sus órganos al microscopio. El análisis microscópico de tejidos (histopatología) posibilita la distinción de la mayoría de los procesos y etiologías de las enfermedades, ofrece una primera aproximación, y en muchos casos la única, al estado de la calidad del agua y además sugiere ciertas anomalías en el manejo zootécnico de los peces.

En el caso de las infecciones bacterianas, se requieren técnicas más finas de clasificación de los patógenos, ya sea por recuperación directa de las bacterias (microbiología) o por detección de su material genético (biología molecular).

El objetivo de este manual es describir los procedimientos fundamentales para la toma y el envío de muestras para diagnóstico de enfermedades en peces ornamentales, se destacan las variaciones en las técnicas debidas a diferencias anatómicas de algunas especies.

GENERALIDADES

- Es ideal que un profesional veterinario inspeccione las condiciones de manejo de las granjas o bodegas donde se mantienen los peces y sea quien tome los diferentes tipos de muestras para identificar certeramente los problemas. Si no es posible, el encargado de los peces debería tener un entrenamiento básico en los procedimientos para poder enviar la mejor muestra al laboratorio.
- Las muestras para histopatología y microbiología deben tomarse en el menor tiempo posible después de la insensibilización o del sacrificio de los peces.
- Si se dispone de un número representativo de animales enfermos, se deben tomar primero las muestras de microbiología y de individuos diferentes tomar los tejidos para histopatología. En caso de disponer de un reducido número de peces o uno solo, se debe hacer el esfuerzo de tomar las muestras para los dos laboratorios, ejerciendo especial cuidado con la manipulación de los tejidos, que debe ser mínima para asegurar la calidad de la evaluación histopatológica.
- Cada una de las muestras (para histopatología, microbiología o biología molecular) debe rotularse en forma independiente. Para las muestras de histopatología debe ser rotulado el recipiente y su tapa; en la mayoría de los casos se pueden utilizar marcadores indelebiles, sin embargo, si existe el riesgo de derrame de formalina, se hace un rótulo en papel y lápiz y se introduce en el frasco con la muestra.
- Todas las muestras deben venir acompañadas de una historia que contenga la siguiente información:
 1. Datos de contacto del responsable del caso
 - a. Nombre de la empresa
 - b. Nombre del propietario
 - c. Nombre de la persona encargada de los peces
 - d. Región geográfica
 - e. Teléfonos
 - f. Correo electrónico
 2. Descripción de la población afectada:
 - a. Nombre(s) común(es) de la(s) especie(s)
 - b. Grupo etáreo, talla o peso
 - c. Procedencia y tiempo de confinamiento
 - d. Número de peces por área
 - e. Porcentaje aproximado de enfermos
 - f. Porcentaje aproximado de mortalidad
 - g. Fecha de inicio de la enfermedad o de la mortalidad
 3. Descripción del problema:
 - a. Ubicación de los peces en la columna del agua

- b. Consumo de alimento
 - c. Comportamiento en natación
 - d. Estado de alerta (letargo, excitación)
 - e. Alteraciones en el cuerpo, las aletas, las branquias, las papilas, los ojos, la boca
4. Condiciones de manejo:
- a. Tipo de alimento y frecuencia de alimentación
 - b. Forma y frecuencia de los recambios de agua
 - c. Características básicas del agua de los acuarios, de los estanques y del reservorio de agua.
 - d. Adición de sustancias al agua
 - e. Prácticas de manejo recientes sobre el (los) lote (s) afectado (s)

ENVÍO DE LAS MUESTRAS

Se pueden remitir dos tipos de muestras:

- Animales vivos, muestra ideal
- Animales en formalina

Animales vivos

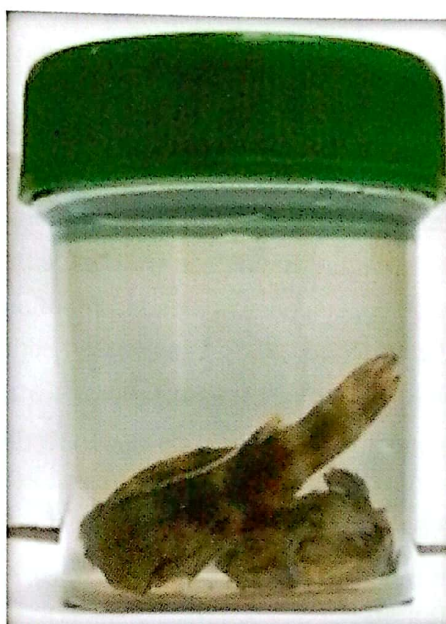
Son la muestra ideal; ofrecen la posibilidad de hacer varios tipos de análisis, entre ellos histopatológicos, microbiológicos, parasitológicos y moleculares; además de evaluar un mayor número de peces y obtener muestras de mejor calidad.

El número ideal debe ser 10 peces adultos o 20 larvas, alevinos o peces diminutos por cada lote que presente problemas. Se deben enviar peces vivos, nunca agonizando o muertos; la mitad de ellos con problemas evidentes y la otra mitad aparentemente sanos. Se empacan al igual que los peces que se envían para exportación, en bolsas con tres partes de oxígeno por una de agua.



Animales fijados en formalina

Disminuye la posibilidad diagnóstica principalmente por la imposibilidad de recuperar bacterias patógenas de los tejidos y reduce la eficacia de las pruebas de biología molecular; además, aunque sencillo el procedimiento de fijación, generalmente lo hacen mejor quienes tienen experiencia, claro, esto no excluye que otros aprendan a hacerlo bien. Se deben utilizar frascos herméticos de boca ancha y tapa rosca. La toma de los tejidos debe hacerse según el protocolo de necropsia y toma de muestras para patología.



NECROPSIA Y TOMA DE MUESTRAS PARA PATOLOGÍA

Instrumental y materiales

- Frascos con formalina buferada al 3,7%. Los frascos deben ser plásticos y de boca ancha.
- Jeringa 10 ml.
- Agujas de insulina o similares.
- Instrumental de disección (tijera curva de punta fina, pinza con garra, pinza sin garra, mango y cuchillas de bisturí).
- Anestésicos: tricafina (MS-222) o hielo.
- Recipiente de anestesia.
- Bandeja de disección preferiblemente blanca y plana.
- Papel secante.
- Equipo de seguridad (bata, guantes de látex, tapabocas, gafas).
- Marcador de tinta indeleble.

Procedimiento

Anestesia e insensibilización

Los peces pueden ser anestesiados con una solución de tricaina (MS-222) en agua (50-300 ppm según la especie) o en una mezcla de agua con hielo. El aceite de clavo en solución alcohólica funciona muy bien como anestésico, sin embargo las concentraciones y el efecto de la sustancia y el diluyente deben probarse en los peces tropicales.

Para ciertas especies se utilizan concentraciones letales del anestésico para evitar cualquier tipo de sensibilidad, en ese caso, se debe acelerar la toma de la muestra. Dos buenos indicadores de anestesia profunda son la posición lateral en el agua y la pérdida del reflejo de huida. En peces aplanados ventralmente: cuchas, doras, rayas, pez hoja, medio pez, catalinas y similares únicamente cuenta la última.

Disección

A continuación se describirá secuencialmente el procedimiento y se esbozarán algunas variaciones en la técnica según diferencias anatómicas de las especies. Se hará énfasis en dos tipos de morfologías: peces aplanados lateralmente y peces aplanados ventralmente.

- Luego de la anestesia, se coloca el pez estrictamente en decúbito lateral derecho para los aplanados lateralmente (Fig. 1A) o en decúbito dorsal para los aplanados ventralmente (Fig. 1B).
- Insensibilizar completamente por medio de un corte de la médula espinal inmediatamente posterior al borde caudal del opérculo (Fig. 2, A y B). En este estado, se evalúa cualquier alteración en la forma o los colores (lesión) de la cabeza, el cuerpo, las aletas; con especial atención a los ojos, la boca, las papilas, las narinas y las especializaciones cutáneas de ciertas especies. Algunas lesiones comunes son: enrojecimiento, puntos blancos, úlceras, erosiones, pérdida de escamas, nódulos, opacidad ocular, pigmentación o despigmentación de la piel y visualización de ectoparásitos.

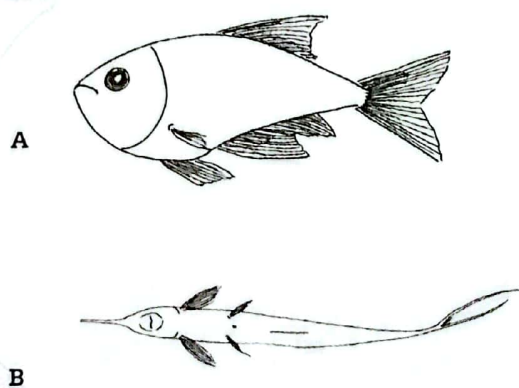


Figura 1. Posición para la necropsia. **A.** Peces aplanados lateralmente. **B.** Peces aplanados ventralmente.

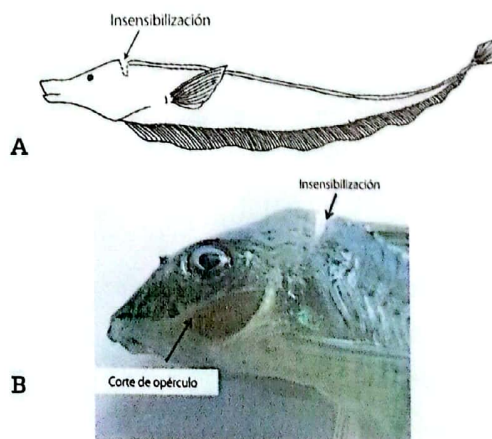


Figura 2. A y B. Insensibilización y corte de opérculos

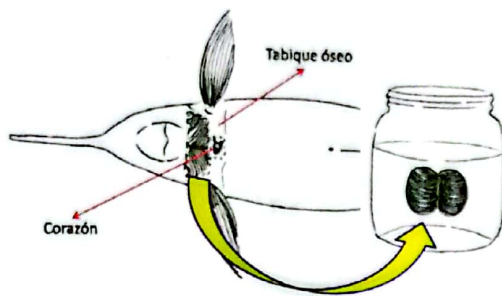


Figura 2C. Disección de branquias en cuchas. Según el tamaño del pez se pueden exponer o retirar completamente.

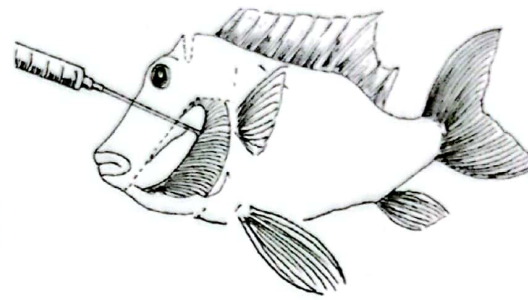


Figura 2D. Baño de las branquias con formalina.

- Un raspado de piel puede hacerse en este momento de la necropsia. Con el borde de una lámina portaobjetos o con el bisturí, suavemente se roza la superficie de la piel afectada y el material obtenido se esparce sobre la lámina portaobjetos, se agrega una gota de agua destilada estéril y se cubre con una lámina cubreobjetos. Debe ser evaluado inmediatamente al microscopio.
- Retirar con tijera ambos opérculos (Fig. 2B). En cuchas, las branquias se exponen por medio de un corte rectangular que pasa paralelo al tabique óseo y al borde caudal de la boca (Fig. 2C).
- Una vez expuestas las branquias es posible hacer una biopsia. Se pinza el arco branquial y se corta en cada extremo (dorsal y ventral) del mismo. Se ubica el tejido sobre una lámina portaobjetos, se agrega una gota de agua destilada estéril y se cubre con una lámina portaobjetos. Debe observarse al microscopio inmediatamente.
- Bañar las branquias con abundante formalina después de retirar los opérculos y tomar la biopsia (Fig. 2D). Pinzar el arco y cortar con tijera las inserciones dorsales y ventrales de las branquias. Llevar el paquete completo a los frascos con formalina (Fig. 2C). En peces pequeños se deben tomar ambos paquetes branquiales.
- Incidir el abdomen por medio de dos cortes que inician en la papila anal, el primero es curvo y termina en la inserción dorsal de las branquias, el segundo es recto y por la línea longitudinal media llega hasta el extremo inferior del arco branquial (Fig. 3A). Un tercer corte se hace entre los puntos finales de los anteriores. En peces aplanados ventralmente, se hace un corte en óvalo que comienza y termina en la papila anal y pasa por atrás del tabique óseo que separa las branquias del abdomen (Fig. 3B). En tigrillos y cuatro líneas el corte ventral expone el riñón y la vejiga natatoria (Fig. 3C). En coridoras a pesar de ser aplanadas ventralmente, el corte se hace similar a los aplanados lateralmente.
- Retirar completamente el colgajo y evaluar rápidamente las vísceras.
- Rocíar formalina en la cavidad abdominal e inyectar abundante formalina en estómago e intestino hasta que se inflen (Fig. 4, A y B). Antes de abrir el abdomen de cuchas, se debe inyectar formalina por la boca y por la papila anal para intentar llenar el intestino que es muy delgado y extenso.

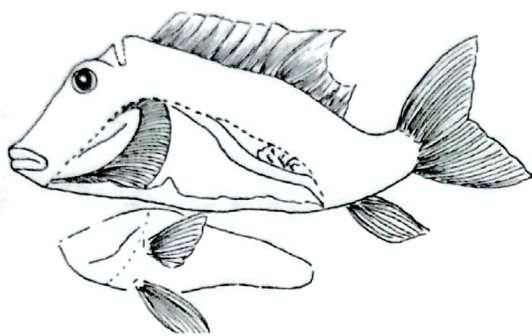


Figura 3A. Disección del abdomen de peces aplanados lateralmente.

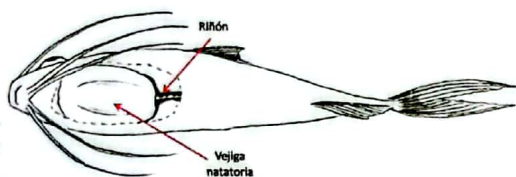


Figura 3C. Disección del abdomen en tigrinos y similares.

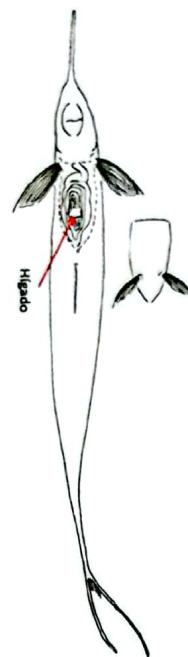


Figura 3B. Disección del abdomen de cuchas.

- Con la pinza sin garra, pinzar el esófago o un extremo duro del estómago y separar el paquete visceral hasta la papila anal (Fig. 4, C y D).
- En cuchas, debido a la dificultad de llenar el intestino con el fijador, después de retirar el ovillo completo, se hacen cortes de pequeños segmentos (Fig. 4E).
- Separar la vejiga natatoria y exponer los riñones (Fig. 5). En la mayoría de peces es un órgano único delgado y frágil que descansa a lo largo del aspecto ventral de la columna vertebral. Es preferible tomar un segmento de musculatura que arrastre el órgano en lugar de disecarlo por separado. En cuchas, el riñón se ubica inmediatamente caudal al tabique óseo y se expone al retirar el ovillo intestinal (Fig. 4D). En tigrinos y bagres similares, el riñón tiene forma de "Y" y descansa sobre la porción posterior de la vejiga natatoria (Fig. 3C).
- Los ojos se retiran empujándolos desde la cavidad oral y rompiendo con tijera las inserciones orbitales.
- El corazón se expone al terminar el segundo corte de la pared abdominal en peces aplanados lateralmente; debe pinzarse por el extremo distal del cono arterioso y retirarse completo. En cuchas está alojado en medio del tabique óseo que separa las branquias de la cavidad abdominal (Fig. 2C).
- El cerebro se expone por medio de un corte rectangular por detrás de los ojos. La mayoría de las veces debido al pequeño tamaño de los ejemplares, se puede llevar al fijador la cabeza completa, incluyendo los ojos, el cerebro expuesto y eventualmente las branquias y el corazón.

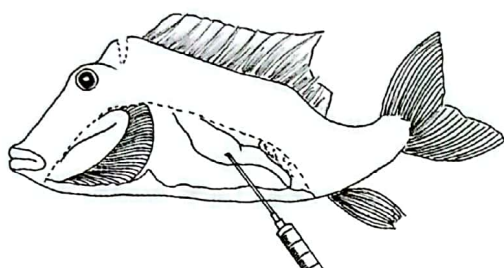


Figura 4A. Inyección de formalina en estómago e intestino.

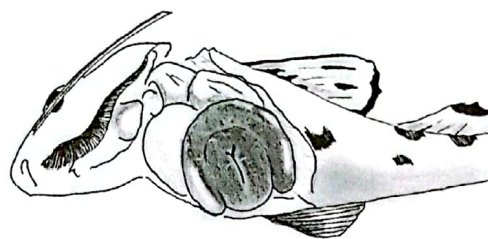


Figura 4B. Inyección de formalina en estómago e intestino. Se usa abundante formalina hasta que el intestino se distienda.

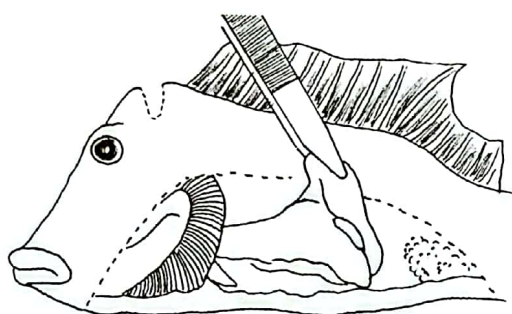


Figura 4C. Disección del paquete visceral en aplanados lateralmente. Se pinza una porción dura del esófago o del estómago y se arrastra hacia atrás.

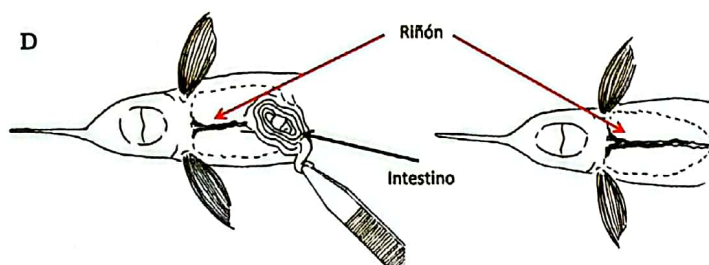
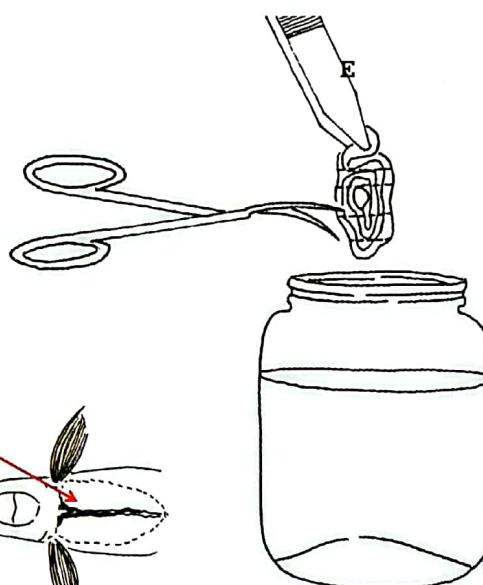


Figura 4D y E. Disección del paquete visceral en cuchas. D. Al retirar el paquete de vísceras se expone el riñón. E. Debido al pequeño diámetro del tubo, se requiere hacer cortes de pequeños fragmentos de intestino para asegurar una preservación adecuada.

- Por último se toma un pedazo de piel. Si tiene apariencia normal, 1 cm² es suficiente. Si tiene lesiones se toman varias porciones que incluyan tejido sano y lesionado.
- Todos los órganos: estómago, intestino, hígado, bazo, riñón, gónadas, vejiga natatoria, branquias, corazón, cerebro, ojos, piel y si es posible timo y pseudobranquia deben ser llevados enteros a los frascos con formalina a menos que sean muy grandes. En ese caso se toman fragmentos de aprox. 1 cm² teniendo cuidado de tomar tanto áreas sanas como las que presenten cambios.
- Los peces pequeños (aproximadamente 4 cm de longitud) se toman enteros con la cavidad abdominal y orobranquial expuestas y el tubo digestivo saturado de formalina.

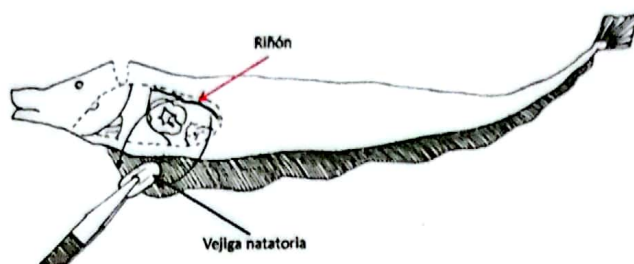


Figura 5. Disección del riñón. En los aplanados lateralmente aparece al retirar la vejiga natatoria.

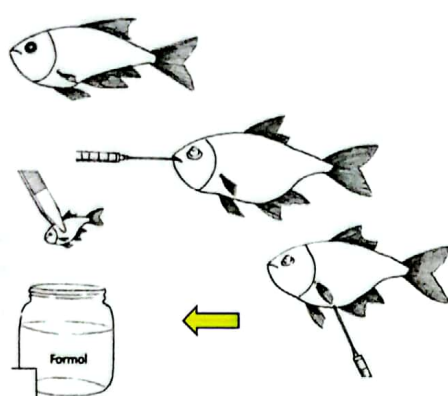


Figura 6A. Inyección de formalina en estómago e intestino en peces diminutos y larvas.

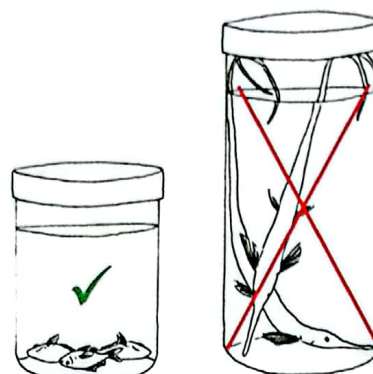


Figura 6B. Tejidos en formalina

- Los peces diminutos (aprox. 1 cm de longitud) como la mayoría de tetras, únicamente se inyectan con abundante formalina por la boca y la papila anal y se llevan enteros a los frascos con formalina (Fig. 6A).
- Los órganos deben llevarse en frascos con formalina buferada al 3,7% manteniendo una relación de nueve partes de formalina por una de tejido (Fig. 6B).

TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO CONVENCIONAL

A excepción de las micobacteriosis, los peces ornamentales colombianos sufrieron infecciones por bacterias Gram (-) principalmente compatibles con *Aeromonas* sp. y *Flavobacterium* sp. Con base en esos resultados, las bacterias causantes deben ser recuperadas en lo posible de las lesiones en piel y de las vísceras abdominales, primordialmente del bazo y del riñón, eventualmente del hígado.

Instrumental y materiales

- Peces enfermos
- Anestésico
- Asa bacteriológica con punta en "L"

- d. Dos mecheros de buena flama
- e. Gasas con yodo
- f. Instrumental (tijeras, pinzas con garra y sin garra, bisturí)
- g. Alcohol etílico (>70%)
- h. Agua destilada estéril
- i. Medios de cultivo sólidos preferiblemente en cajas Petri de vidrio.
 - Si se sospecha *Aeromonas* sp. Se deben utilizar agares convencionales como el TSA y el BHI suplementados con sangre desfibrinada ovina al 5%.
 - Si sospechan filamentosas sembrar en agar TYES.
- j. Equipo de bioseguridad (guantes de látex, tapabocas y bata)
- k. Marcador de tinta indeleble
- l. Cinta de enmascarar

Procedimiento

Las muestras para microbiología se toman durante el proceso de necropsia, de manera que hasta la insensibilización del pez se siguen los mismos lineamientos descritos arriba.

Ya que se trata de infecciones causadas por microorganismos habitantes naturales del agua y debido a que prefieren infectar la piel y las superficies mucosas branquiales y gastrointestinales, el aislamiento de las bacterias la mayoría de las veces resulta infructuoso.

Previo a la toma de la muestra se debe mantener el instrumental en alcohol o cloruro de benzalconio (Fig. 7A). En el caso de infecciones de la piel, luego de la insensibilización se recomienda lavar la zona afectada con agua destilada estéril (Fig. 7B) con el fin de retirar material adherido y en alguna medida bacterias contaminantes. En el caso de las aeromoniasis, se debe recordar que cuchas, escalares, cardenales, estrigatas, sapuaras, coridoras y discos, entre otros, desarrollaron la forma cutánea de esta infección, para ellos se recomienda intentar el aislamiento en áreas de piel gruesa, debido a que en aletas y pieles delgadas casi siempre crecieron contaminantes. Después del lavado se debe introducir el asa estéril alrededor de la zona afectada preferiblemente en piel no ulcerada (Fig. 7B). Se debe repetir en varios puntos para aumentar las posibilidades de cultivo. La siembra debe hacerse en los agares con sangre para evidenciar los halos hemolíticos de las *Aeromonas*. Si se presentan erosiones y úlceras en la piel de monedas, se debe tener en cuenta que frecuentemente fueron causadas por bacterias compatibles con *Flavobacterium columnare* y en combinaciones con bacterias similares a *Aeromonas* sp.; de manera que además de intentar aislar las *Aeromonas*, se deben tomar muestras adicionales de la piel de los costados y alrededores de la boca que se vieron repetidamente afectados. La siembra en este caso debe ser en medio TYES o agar Cytophaga. La incubación para ambos tipos de bacterias debe hacerse a 28°C aunque se reporta crecimiento lento de *Flavobacterium* sp., entre 20-24°C.

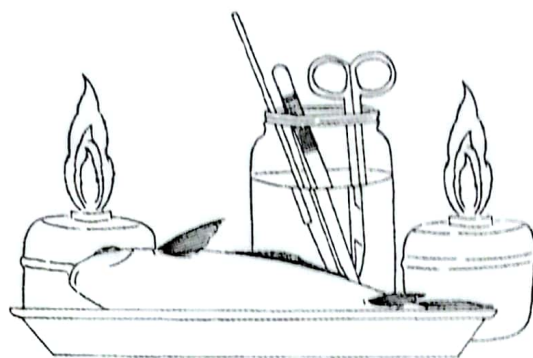


Figura 7A. Toma de muestras microbiológicas. Instrumental en alcohol o cloruro de benzalconio y los mecheros encendidos.

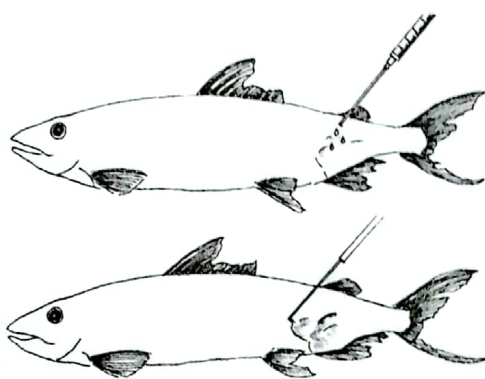


Figura 7B. Cultivo de bacterias a partir de una herida en piel. Lavar la herida con agua destilada estéril.

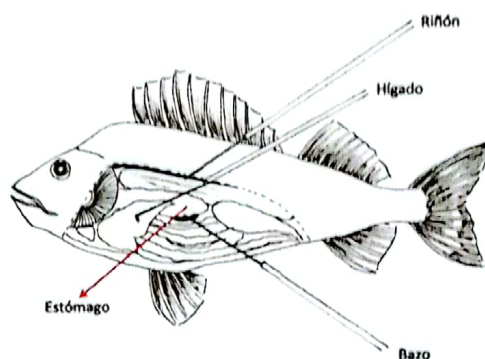


Figura 7C. Cultivo de bacterias del abdomen en peces aplanados lateralmente.

En caso de evidencia gastrointestinal de las infecciones deben tomarse muestras de los órganos internos, principalmente de bazo y riñón (Fig. 7C). Previo a la disección se desinfecta la piel del costado izquierdo frotándola con una gasa impregnada de yodo. Con el instrumental estéril, se disecciona la pared como se mencionó en necropsia. El bazo se expone retirando el paquete intestinal; en la mayoría de los peces, se encuentra en contacto con el aspecto ventral del estómago (Fig. 7C). En cuchas es tan pequeño que es preferible tomar la muestra del hígado (Fig. 3B) y usar el bazo para histopatología. En la mayoría de las especies el riñón se expone al retirar la vejiga natatoria (Fig. 5); en cuchas debe retirarse el ovillo intestinal para evidenciarlo teniendo cuidado de no romper el delgado tubo (Fig. 4D). Las vísceras se pueden mover con el asa para exponer los órganos. En tigrillos, el riñón es fácilmente visible luego del corte ventral de la pared (Fig. 3C). La toma de la muestra se hace por punción y rasgado del tejido. La siembra y el cultivo tienen las mismas consideraciones expuestas en los aislamientos de piel.

Características básicas de las bacterias

Aeromonas hydrophila produce colonias β hemolíticas, blanco-amarillentas o grisáceas, redondeadas de 3 mm de diámetro promedio en 24 h a 28°C en medio aerobio, son muy viscosas; son cocobacilos o bacilos cortos rectos Gram (-). Las flavobacterias producen colonias puntiformes (1 mm) de un amarillo intenso que crecen lentamente en distintos puntos del agar. Son filamentos largos Gram (-). Por su parte la *Edwardsiella tarda* produce colonias similares a *A. hydrophila*, sus morfologías no son discernibles en el microscopio pero *E. tarda* difiere en que no produce hemólisis. Las características bioquímicas fundamentales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de las pruebas fisicoquímicas básicas de las tres principales bacterias Gram (-) detectadas en los peces ornamentales colombianos.

	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. tarda</i>	<i>F. columnaris</i>
Morfología	cocobacilos	cocobacilos	filamentos
Gram	-	-	-
Citocromo oxidasa	+	-	+
Catalasa	+	+	-
Indol	+	+	-
Producción H₂S	+	+	-
Hemólisis	+	-	-
Motilidad	+	+	-
Oxidación glucosa	-	-	+
Fermentación glucosa	+	+	-

La Figura 8A describe la secuencia de clasificación fisicoquímica de bacterias convencionales de peces, a partir de un aislamiento coloreado con Gram.

Luego de la clasificación fisicoquímica básica, lo más recomendable es utilizar un panel comercial de identificación de especie. Algunos de estos requieren el resultado de varias pruebas entre ellas oxidasa, catalasa e indol.

Identificación molecular

La confirmación definitiva del patógeno puede hacerse mediante la amplificación de segmentos de ADN, específicos de cada bacteria, por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el caso de *A. hydrophila* se utilizan primers para amplificar un fragmento de los genes que codifican para la producción de hemolisinas, entre ellas, aerolisina *aerA* (309pb) y hemolisina *ahh1* (130 pb) (Fig. 8B). Por su parte, las Flavobacterias son frecuentemente identificadas por la detección de genes que codifican para hialuronidasas.

CRECIMIENTO EN MEDIO BHI CON SANGRE O TSA

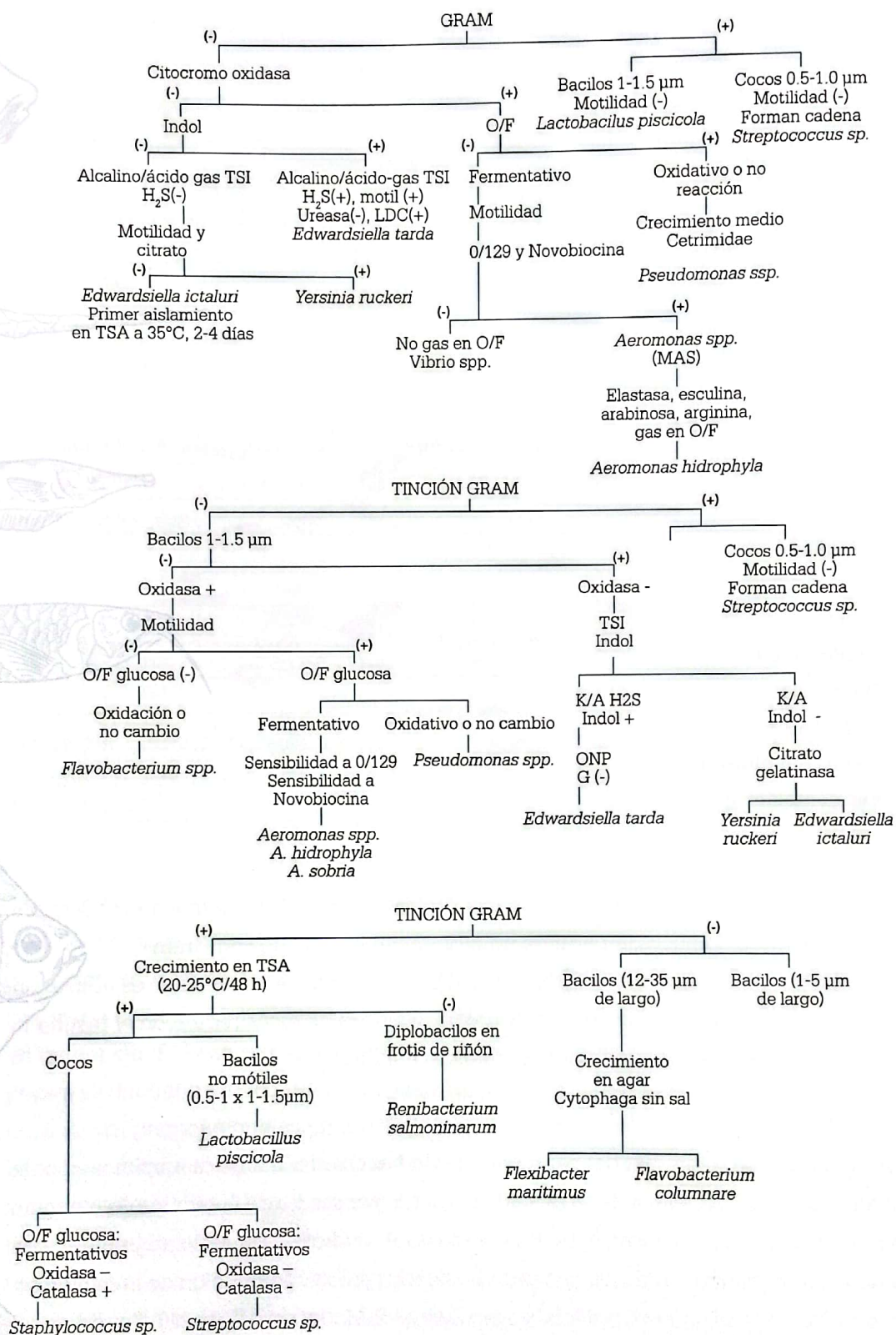


Figura 8A. Algoritmo de clasificación de aislamientos bacterianos de patógenos convencionales recuperados en agar BHI con sangre (adaptado de Espinosa de los Monteros y Labarta, 1988).

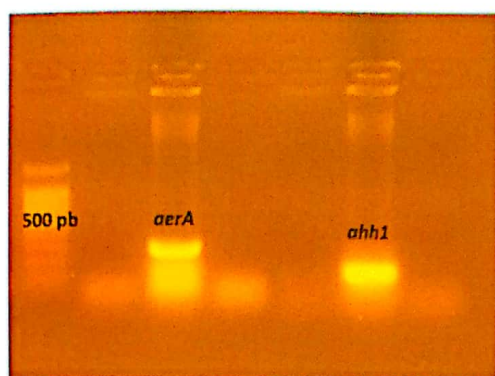


Figura 8B. Clasificación molecular de *A. hydrophila*. Visualización de los genes de la aerolisina *aerA* (309pb) y de la hemolisina *ahh1* (130pb). A partir de una bacteria aislada de una cucha con infección de la piel. Electroforesis en gel de agarosa. Escalera 100pb.

TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT)

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) que inducen enfermedad en peces ornamentales, se encuentran normalmente en el agua. Cuando infectan los peces, generan lesiones en diversos órganos; el riñón y el bazo son los ideales para aislamiento microbiológico e identificación molecular; sin embargo, en peces muy pequeños no es posible obtener dichos órganos, en esos casos se puede utilizar el hígado.

Instrumental y materiales

- Peces enfermos
- Anestésico
- Dos mecheros de buena flama
- Gasas con yodo
- Instrumental (tijeras, pinzas con garra y sin garra, bisturí)
- Cloruro de benzalconio
- Alcohol etílico (>70 %)
- Buffer TE1X (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- NaOH 4N
- Viales estériles de 2ml
- Hisopos de algodón estériles
- Nevera con geles congelados
- Medio de cultivo sólido Lowenstein-Jensen (LJ) servido en cuña en tubos de 10ml tapa rosca
- Equipo de bioseguridad (guantes de látex, tapabocas y bata)
- Marcador de tinta indeleble
- Cinta de enmascarar
- Bolsa roja para desechos biosanitarios

Procedimiento

Previo a la toma de la muestra, se debe organizar el área de trabajo en un lugar protegido de corrientes fuertes de viento. La superficie de trabajo debe limpiarse con alcohol; luego ubicar el instrumental en un recipiente con cloruro de benzalconio (Fig. 7A), encender los mecheros y tener a la mano los tubos con LJ, los viales estériles, los hisopos de algodón estériles, la nevera, el buffer TE y el NaOH (Fig. 9A).

Las muestras para aislamiento microbiológico y congelación de tejidos se toman durante el proceso de necropsia, de manera que hasta la insensibilización del pez se siguen los mismos lineamientos descritos anteriormente.

- Una vez insensibilizado el pez, ubicarlo en decúbito lateral derecho o dorsal dependiendo de su anatomía (Fig. 1, A y B), en medio de los dos mecheros encendidos. Desinfectar la piel del costado izquierdo con yodo.
- Incidir el abdomen como fue descrito en el procedimiento de necropsia y exponer las vísceras.
- Con las pinzas tomar el bazo y cortar un fragmento de 5-10 mm de diámetro para conservarlo en un vial con 1ml de buffer TE 1X a -20°C ; este tejido puede ser enviado refrigerado al laboratorio de diagnóstico molecular más cercano en el menor tiempo posible.
- Otro fragmento del mismo tamaño y del mismo órgano se ubica en otro vial, se adiciona 1 ml de NaOH 4N y con un hisopo de algodón estéril macerarlo y dejarlo en contacto con el reactivo por 2 min., si se deja más tiempo se corre el riesgo de eliminar las micobacterias presentes.
- El hisopo de algodón es utilizado para sembrar la muestra en dos tubos con LJ, dispersando el material en toda la superficie del medio (Fig. 9A).
- El vial con los restos de tejido se desecha en bolsa roja al igual que el hisopo.

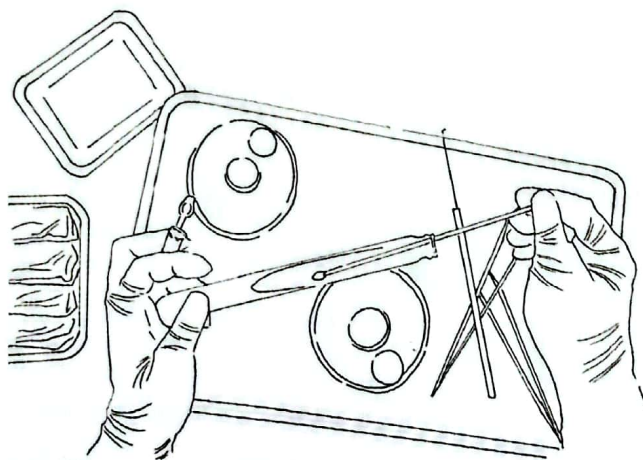


Figura 9A. Aislamiento microbiológico de micobacterias no tuberculosas (MNT). En un vial de 2 ml con 0.5 ml de NaOH 4N macerar el tejido con un hisopo estéril. Sembrar en zigzag a lo largo de la cuña de un tubo con medio LJ.

El tejido en buffer TE se congela a -20°C hasta su uso para diagnóstico molecular. Los tubos con LJ se incuban a 28°C , uno en presencia de luz y el otro en oscuridad, por 3 meses observando diariamente el crecimiento de colonias.

Características básicas de las MNT

Las MNT reúnen más de 175 especies de micobacterias. Se dividen en tres grupos: fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas, la diferencia es dada por la habilidad de sintetizar pigmentos en presencia de luz, por esto se incuban en luz y oscuridad. Adicional a esta clasificación, las MNT pueden ser de crecimiento rápido (<7 días) o de crecimiento lento (>1 semana). La morfología de las colonias también varía ampliamente de acuerdo a la especie aislada, desde colonias lisas, rugosas, con forma de huevo frito, forma de coral, bordes irregulares o continuos y diversos diámetros. La descripción de las características fenotípicas y moleculares de las MNT se puede consultar en <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>. La información de los aislamientos de MNT patógenas presentadas aquí son las identificadas en peces ornamentales colombianos.

Todas las MNT son positivas a la coloración de Zielh-Neelsen (ZN). *M. fortuitum* es no cromógena, de crecimiento rápido y forma una colonia con morfología de huevo frito, color beige (Fig. 9B). *M. peregrinum* es no cromógena, de crecimiento lento y colonia lisa color beige (Fig. 9C). *M. marinum* es fotocromógena, de crecimiento lento y colonia lisa naranja (Fig. 9D). La identificación de género y especie se hace por métodos moleculares.

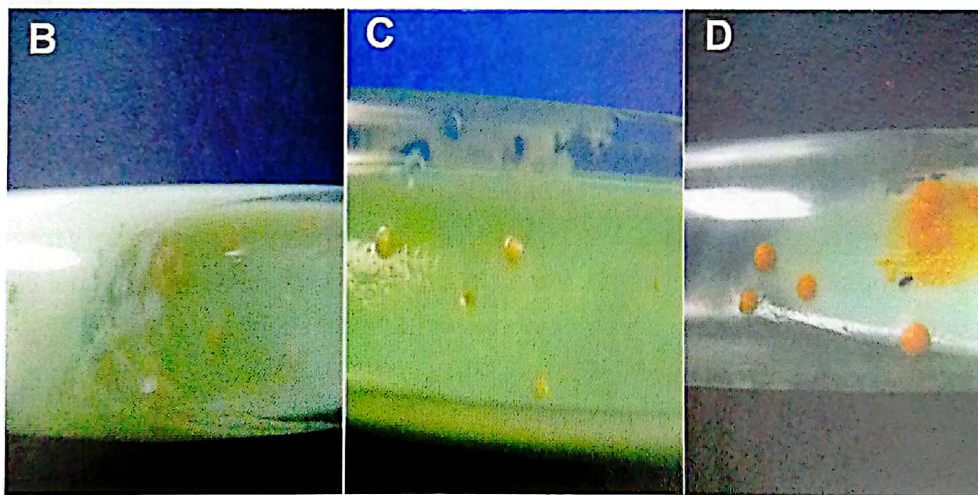


Figura 9B. *Mycobacterium fortuitum*. Aislamiento del riñón de un beta de cultivo del departamento del Meta. No pigmentada, colonia blanco cremosa con morfología de huevo frito, crecimiento rápido (7 días). **C.** *Mycobacterium peregrinum*. Aislamiento del riñón de un ramirezi de acopio de las bodegas de exportación en Bogotá. No pigmentada, colonia lisa blanco cremosa, crecimiento lento (20 días). **D.** *Mycobacterium marinum*. Aislamiento del riñón de un beta de cultivo del departamento del Meta. Fotocromógena, colonia lisa naranja, crecimiento lento (19 días).

Identificación molecular

La identificación molecular de las MNT se puede hacer a partir de aislamientos bacterianos, tejidos frescos o congelados y tejidos embebidos en parafina. Para los diferentes métodos el primer paso es la extracción de ADN, seguido por la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la proteína de estrés térmico de 65 kilodaltons (*hsp65*) y posterior secuenciación de los amplicones obtenidos.

La extracción de ADN a partir de colonias se hace sometiendo a ebullición a 94°C por 15 min. una porción de la colonia o varias de ellas en 150 µl de agua destilada.

La extracción de ADN a partir de tejidos frescos, congelados o embebidos en parafina se hace por el método de tiocianato de guanidio. Para el caso de tejidos procedentes de cortes de parafina, se deben tomar 5 a 10 cortes de 5 a 10 µm cada uno, depositarlos en un vial de 2 ml para luego desparafinarlos. En el caso de tejidos frescos, estos deben estar previamente macerados en mortero y pistilo o directamente con pistilo en viales de 1,5 o 2 ml. El ADN es extraído como se describe a continuación:

- Reconstituir los tejidos con 200 µl de buffer TE 1X.
- Digerir agregando a cada vial 10 a 20 µl de proteinasa K de 20 mg/ml.
- Incubar a 56°C por 3 a 12 h. Se inactiva la proteinasa K incubando las muestras a 94°C por 10 min.
- Dejar enfriar y agregar a cada una de las muestras 250 µl de tiocianato de guanidio 67%, llevar a incubación a 80°C por 30 min.
- Agregar 250 µl de isopropanol para precipitar el ADN.
- Mezclar con vórtex y centrifugar a 12.500 rpm por 15 min. a temperatura ambiente.
- Eliminar todo el sobrenadante y conservar el pellet.
- Agregar 500 µl de etanol 70%, para lavar el ADN y mezclar con vórtex.
- Centrifugar a 12.500 rpm por 5 min. a temperatura ambiente. Eliminar todo el sobrenadante y conservar el pellet.
- Retirar con micropipeta el etanol remanente y dejar secar el pellet.
- Reconstituir el ADN en 50 a 200 µl de buffer TE 1X (según el pellet obtenido) y mezclar con micropipeta. Si se va a emplear en el mismo día o si se desea guardar por varios días puede ser refrigerado, por más tiempo requiere almacenamiento a -20°C.
- Si es necesario, se cuantifica por espectrofotometría o fluorometría una alícuota del ADN resuspendido y/o se observa en gel de agarosa al 1,5%.

Amplificación y secuenciación del gen *hsp65* del género *Mycobacterium*

El gen *hsp65* (heat shock protein 65) está presente en todas las micobacterias, y es mas variable que el gen 16S rRNA en estos microorganismos, por lo que permite diferenciar entre especies genéticamente relacionadas. Se amplifica un fragmento de 441 pb con los iniciadores F927 (5'-GGACCCGTACGAGAAGAT-3') y Tb12 (5'-CTTGTCTGAACCG-CATACCCT-3') para posteriormente ser secuenciados e identificados en género y especie (Telenti *et al.*, 1993; Pourahmad *et al.*, 2009). El procedimiento general es el siguiente:

- Se mezclan los componentes de la reacción de la PCR en la cantidad y orden descritos en la Tabla 2, en viales debidamente identificados.
- Entre el agua destilada y el ADN se debe adicionar hasta 35,4 μ l, para completar 50 μ l en volumen total por cada muestra.
- En el termociclador se amplifica con el siguiente perfil: un paso inicial de 5 min de incubación a 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.
- Luego se hace la electroforesis en gel de agarosa para observar si hubo amplificación. Para tal efecto se debe sembrar en el gel una alícuota de 5 a 10 μ l de cada reacción de PCR. El producto amplificado obtenido a partir de muestras positivas (presencia del género *Mycobacterium*) debe ser de 441 pares de bases (pb) (Fig. 10).

Una vez que se observa amplificación positiva, el volumen restante del tubo de PCR puede ser enviado a secuenciación para su identificación de género y especie, mediante el alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas en una base de datos de internet como el Genbank de NCBI.

Tabla 2. Reactivos para amplificación de *hsp65*

Orden de adición	Reactivo	Concentración	Cantidad por vial (μ l)
1	Buffer	10x	5 μ l
2	MgCl ₂	25mM	3 μ l
3	dNTPs	10mM	2 μ l
4	F927	10mM	2 μ l
5	Tb12	10mM	2 μ l
6	Taq polimerasa	5U/ μ l	0,6 μ l
TOTAL			14,6 μl

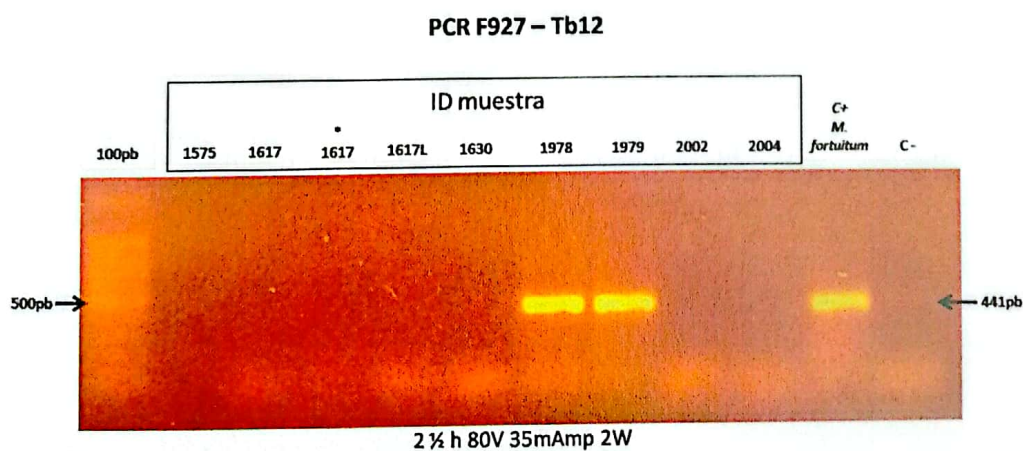


Figura 10. Identificación molecular de *Mycobacterium* sp. Visualización del gen *hsp65* (441 pb) a partir de aislamientos micobacterianos obtenidos de bazo. Escalera 100pb.

Bibliografía

- Espinosa de los Monteros J and Labarta U. Patología de los peces. Madrid, 1988.
- George W., Nakata M, Thompson J. et al: Aeromonas related diarrhea in adults. Arch. Intern. Med. 145: 2207, 1985.
- Koneman Elmer. Diagnóstico microbiológico 6 edición. Ed. Médica Panamericana, 2008. Pag. 276.
- Pourahmad F, Thompson KD, Adams A, Richards RH. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction–Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for identification of aquatic mycobacteria. J Microbiol Methods. 76:128-135, 2009.
- Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, et al. *hsp65* Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 37(3):852-857, 1999.
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Botrget E, Bodber T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. J Clin. Microbiol. 31(2):175-178, 1993.
- Yanong RP. Necropsy Techniques for Fish. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.12 (2): 89-105, 2003.



Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural
República de Colombia

