

## **PATOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA PRELIMINAR EN LA MORTALIDAD ASOCIADA CON UN SÍNDROME ASCÍTICO EN DONCELLA *Pseudoplatystoma fasciatum***

Daniel PAREDES-LÓPEZ<sup>1\*</sup>, Carmela REBAZA-ALFARO<sup>2</sup>, Ricardo OLIVA-PAREDES<sup>3</sup>

- 1 Departamento de Ciencia Animal, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Av. Universitaria s/n, PO BOX 156, Tingo María, Perú. E-mail: daniel.paredes9@gmail.com.
- 2 Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Km. 15 Pucallpa, Perú. E-mail: crebaza@hotmail.com.
- 3 Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía Peruana, Carretera San José de Tushmo Km 0.5, Yarinacocha, Pucallpa, Perú

### **RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue identificar preliminarmente la patología y el agente causal de la mortalidad de un lote de 1100 alevinos de doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* en un sistema de crianza en estanque en la ciudad de Pucallpa, Región Ucayali, Perú. Al iniciarse el proceso patológico en los alevinos se determinó los niveles de hematocrito y hemoglobina. Después de la necropsia se extrajo líquido ascítico de branquias y vejiga natatoria inoculándose sobre agar sangre y agar Mc Conkey luego se repicó en medio TSI y agar cetrimide. Clínicamente se evidenció que los alevinos sobresalían a la superficie del agua, mostrando disnea y pérdida de equilibrio. Los resultados determinados en niveles de hematocrito y hemoglobina fueron de 2.8% y 1.83 g/dl respectivamente. En la necropsia se evidenció que las branquias presentaban coloración pálida con edema y abultamiento del abdomen por contenido de líquido de color amarillo sanguinolento. El peritoneo mostró una coloración sanguinolenta y edema. La vejiga natatoria mostró un contenido acuoso de color blanquecino. El hígado presentó incremento en tamaño y coloración amarillo ámbar. El páncreas presentó incremento en volumen y coloración blanco grisáceo. En el intestino se encontró abundante contenido de líquido en el lumen. En los medios de cultivo agar sangre, Mc Conkey, TSI y cetrimide se identificó *Pseudomonas* sp. En conclusión, en la mortalidad de los alevinos de *Pseudoplatystoma fasciatum* se identificó un cuadro de anemia hemolítica y ascitis asociada con la infección por *Pseudomonas* sp.

**PALABRAS CLAVE:** *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudomonas* sp., ascitis, anemia hemolítica

## **PRELIMINARY PATHOLOGY AND BACTERIOLOGIC IDENTIFICATION IN THE MORTALITY ASSOCIATED WITH AN ASCITIC SYNDROME IN DONCELLA *Pseudoplatystoma fasciatum***

### **ABSTRACT**

The objective of the present research was to describe the pathology and causal agent of *Pseudoplatystoma fasciatum* mortality in an intensive system located in Pucallpa, Ucayali Region, Peru. 1100 young fish were evaluated clinically in the estuaries; hematocrit, and hemoglobin levels were determined. After the necropsy, ascitic fluid, gills and natatory bladder inocula were streaked on blood and Mc Conkey agar and the growth was replicated on TSI and cetrimide agar. Clinically, fish were floating on the water surface showing breathlessness and loss of equilibrium. Hematocrit and hemoglobin levels were 2.8% and 1.8g/dl respectively. At necropsy, pale color and edema in gills, abdominal bloating containing abundant yellowish bloody fluid in the cavity were found. The peritoneum showed a bloody coloration, edema and the natatory bladder a whitish fluid content. The liver was yellowish and the pancreas whitish-gray, and both showed increased size. In lumen of the intestine, abundant fluid was found. Using the blood, Mc Conkey, TSI and cetrimide agars, *Pseudomonas* sp was identified. In conclusion, *Pseudoplatystoma fasciatum* mortality resulted from a hemolytic anemia and ascitis associated with *Pseudomonas* sp. infection.

**KEYWORDS:** *Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudomonas* sp., ascitis, hemolytic anemia

## INTRODUCCIÓN

El incremento de la acuicultura ha sido uno de los cambios más notables en la producción global de alimentos en los últimos 100 años. El crecimiento de la población, incremento en la demanda de alimentos acuáticos y disminución de la captura de peces en ambientes naturales han hecho que la práctica de crianza de peces y otros animales acuáticos en ambientes controlados se expanda rápidamente hasta llegar a ser una de las mayores industrias globales. Sin embargo, este rápido crecimiento de la acuicultura ha sido también una fuente de cambios producidos por el hombre a una escala masiva, originando que los animales acuáticos hayan sido desplazados de sus ambientes naturales, criados en altas densidades, expuesto a stress medioambiental, y provistos de alimentos artificiales o no naturales (Walker & Winton, 2010).

El desarrollo de la acuicultura intensiva en el Perú, particularmente en la región amazónica está en un crecimiento acelerado en los últimos años, sin embargo a medida que esta se desarrolla está sujeta a la aparición de enfermedades aún desconocidas para las especies piscícolas nativas de esta región.

En esta perspectiva el presente trabajo pretende contribuir al manejo de la doncella en sistemas de cultivo, a través de la caracterización de la patología e identificación de la causa de la misma en un lote de doncellas en la fase de alevinos de producción intensiva en la región Ucayali- Pucallpa, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en las instalaciones de la estación experimental del instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, ubicado en el Km 12.4 de la carretera Federico Basadre (Provincia de Coronel Portillo, región Ucayali) y en el laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María Ubicado en el Km 1.5 carretera a Huánuco.

### AMBIENTE DE CRIANZA

Mil cien alevinos de doncella de 3 meses de edad y 6.5 cm de longitud se sembraron a una densidad de un alevino/m<sup>2</sup> en un estanque seminatural con una profundidad de 1.6 m. al cual se incorporó gallinaza como abonamiento para la producción de plancton. Los parámetros fisicoquímicos del agua del estanque de crianza en el mes de Julio (estación de invierno para hemisferio sur) tuvieron un rango medio de temperatura de 24 a 26° C, pH 6.7-7.5, oxígeno 1.5-2.4 mg/l, amoníaco 0.2 mg/l, nitritos 0.05 mg/l y nitratos

25 mg/l. La temperatura durante la última semana previa al inicio de mortalidad se considera como baja al promedio normal.

### EXAMEN CLÍNICO

En condiciones de estanque se examinó básicamente el comportamiento frente al grupo, su desplazamiento, reacciones ante la presencia de alimento, forma de respiración, la condición corporal en toda la población de un lote consistente en 1100 alevinos de *P. fasciatum*.

### EXAMEN DE NECROPSIA

El análisis consistió en la evaluación de un lote de 28 alevinos de doncella, los cuales presentaban abultamiento abdominal; éstos fueron examinados externamente y posterior a ello, diseccionados. Mediante observación se evaluó las características principales como el color, tamaño y morfología de las cavidades y de cada uno de los órganos internos. Mediante punción se extrajo líquido ascítico para su evaluación bacteriológica y citológica.

### PATOLOGÍA CLÍNICA

Se analizaron 28 alevinos de doncella que presentaban un comportamiento anormal (flotación sobre la superficie del estanque) y abultamiento del abdomen, adicionalmente se analizaron dos alevinos que se encontraban clínicamente normales y manejados en laboratorio. Para el análisis de los 30 alevinos, se tomaron muestras de sangre mediante el seccionamiento de la cola en tubos conteniendo EDTA. En estas muestras se determinó el hematocrito mediante el método de microhematocrito en una centrifuga Hettich EBA 20 y la hemoglobina mediante el método de cianometahemoglobina en un espectrofotómetro Boeco Germany S-22 UV/visible. Mediante coloración de Giemsa se realizó evaluación citológica del líquido ascítico.

### AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO

Se realizó coloración Gram de muestras de líquido ascítico. De dos alevinos necropsiados se tomaron muestras de branquias, líquido ascítico y vejiga natatoria en recipientes apropiados y estériles. Las muestras se inocularon sobre agar Mc Conkey y agar sangre conteniendo 5% de eritrocitos de ovino y se incubaron a 25°C por 48 horas (Noga, 2000), luego se repicaron sobre agar cetrimide y medio TSI (Quinn *et al.*, 1999).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### EXAMEN CLÍNICO

A los 2.5 meses de sembrados los alevinos con una longitud y peso promedio de 15 cm 65 g. respectivamente, se observó que los alevinos sobresalían a la superficie del agua, mostrando supresión al consumo de alimento, ventilación branquial constante, boqueo y pérdida de equilibrio. En un periodo de una semana la mortalidad del lote de alevinos fue el 100%.

### EXAMEN DE NECROPSIA

Veinte alevinos de doncella manejados en recipientes en condiciones de laboratorio, murieron mostrando abultamiento abdominal (Figura 1A), color pálido y edema en las branquias (Figura 1B). De la cavidad abdominal se extrajeron en promedio 5 ml de líquido color amarillo sanguinolento (Figura 1C). El peritoneo mostró una coloración sanguinolenta y edema (Figura 1D). La vejiga natatoria mostró incremento de tamaño y coloración blanco cremoso y con contenido acuoso de color blanquecino (Figura 1E). El hígado y el páncreas presentaron incremento en tamaño, coloración amarillo ámbar en el hígado y blanco grisáceo en el páncreas. En el intestino se encontró la pared dilatada color amarillo ámbar translúcido con abundante líquido en el lumen (Figura 1E).

### PATOLOGÍA CLÍNICA

De las 28 muestras de sangre proveniente de los alevinos que mostraron abultamiento abdominal, se obtuvo un nivel de hematocrito promedio de 2.3% y de hemoglobina de 1.8 g/dl. Así mismo las muestras de líquido ascítico mostraron escasas células de descamación, sin ningún tipo de célula sanguínea.

### AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO

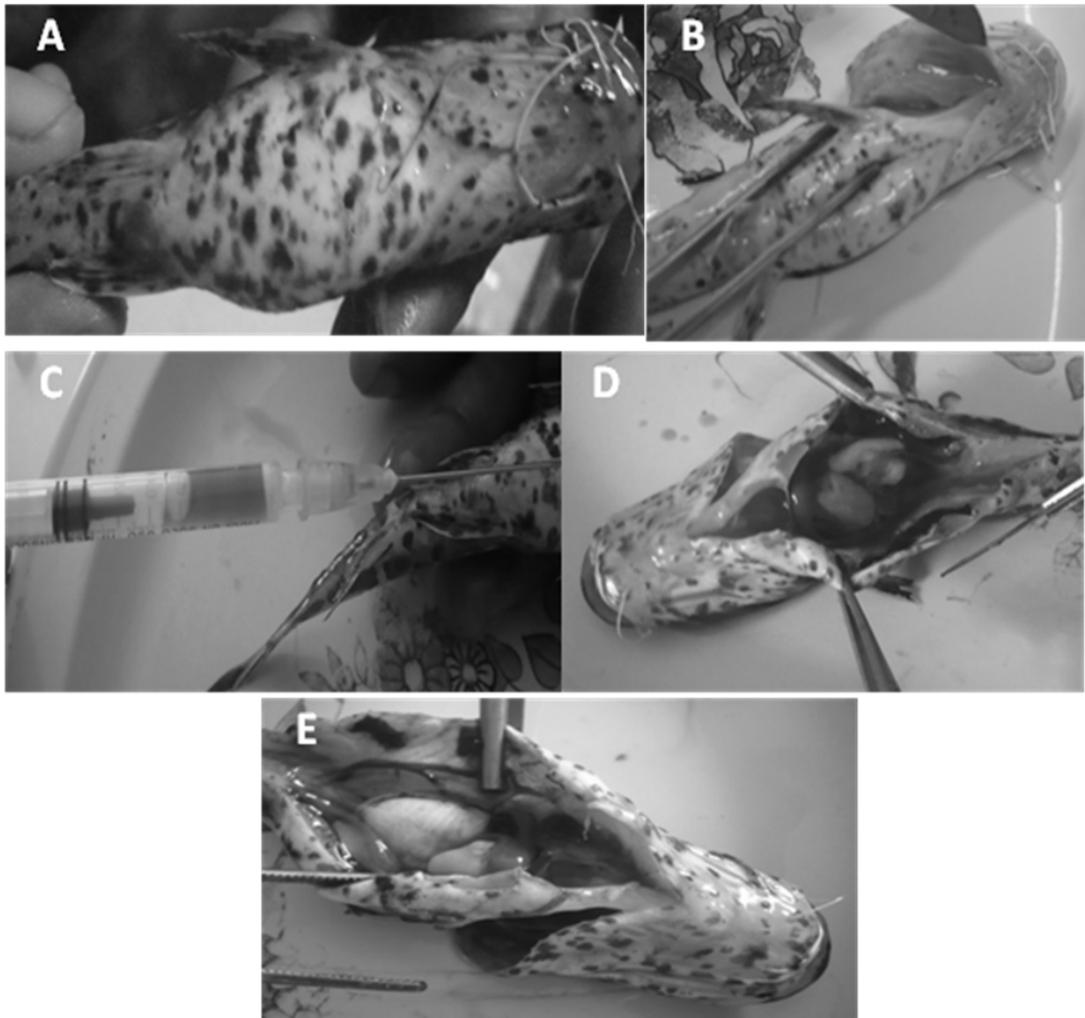
En las muestras de líquido ascítico y mediante coloración Gram se encontró alta densidad de coccobacilos Gram negativos en forma casi pura. El mayor grado de crecimiento tanto en agar sangre así como en agar Mc Conkey se obtuvo a partir de la muestra de líquido ascítico. En el agar sangre se obtuvo un crecimiento denso de colonias grandes, planas de superficie y de bordes irregulares, de color gris y de rápida expansión, las cuales se caracterizaron por la presencia de un halo de hemólisis completa alrededor de las colonias (Figura 2A). En el agar Mc Conkey se obtuvo un crecimiento denso de colonias planas de bordes irregulares de color pálido amarillento debido a pigmentos y sin fermentación de la lactosa (Figura 2B).

Los resultados de niveles de hematocrito, hemoglobina y la presencia de ascitis en los alevinos de doncella, mostraron que la patología en estudio se centra en aquella relacionada con anemia de tipo hemolítica. La anemia hemolítica en diferentes especies animales en general tiene como origen a microorganismos productores de toxinas hemolíticas.

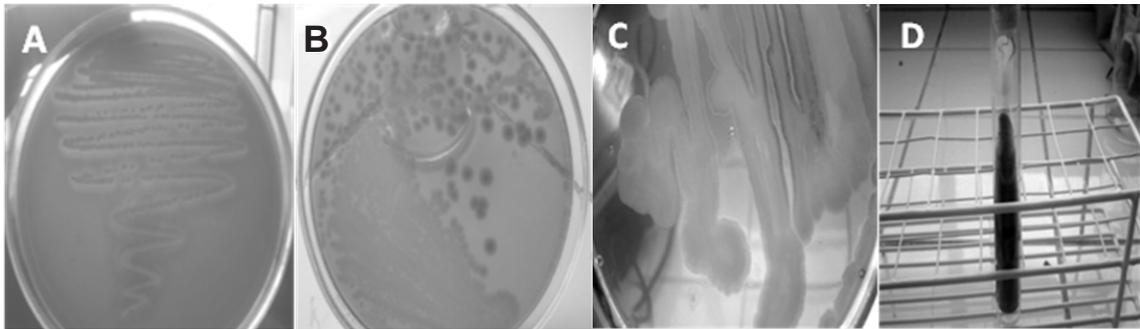
Varias patologías a las cuales se les ha asociado con cuadros de hemorragia, anemia y ascitis, similares a los descritos en el presente estudio se han descrito en diferentes especies de peces criados en sistemas de producción intensiva alrededor del mundo. La septicemia hemorrágica viral se caracteriza por una hemorragia sistémica evidente en las vísceras, piel y la palidez de las branquias, reflejando una anemia generalizada (Smail, 1999). En tanto que el edema en los órganos internos, hemorragia, peritonitis, pequeñas a grandes cantidades de líquido trasparente mezclado con hemorragia en la cavidad peritoneal caracteriza a la viremia de primavera en producción intensiva de carpa (Walker & Winton, 2010). Más allá de estas dos entidades virales documentadas como causas de enfermedades en peces caracterizadas por anemia y ascitis, están aquellas causados por agentes bacteriales y dentro de estas se ha documentado el aislamiento e identificación de algunas especies el género *Pseudomonas* como *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* y *P. plecoglossicida*, las cuales habitan naturalmente en ambientes acuáticos y son parte de la flora gastrointestinal de peces sanos pero causan brotes de mortalidad cuando cambian las condiciones medioambientales (Austin & Austin, 2007; Eissa, Abou El-Ghiet, Shaheen & Abbass, 2010; Nishimori, Kita-Tsukamoto & Wakabayashi, 2000). El aislamiento e identificación fenotípica (bioquímica) de *Pseudomonas* sp. de la patología de doncella en el presente estudio podría asociarse como la causa primaria de la misma. El éxito de *Pseudomonas* sp. como un patógeno es ampliamente debido a su habilidad para sobrevivir en ambientes ampliamente variados y a su arsenal de factores de virulencia. La diseminación de esta bacteria del sitio local de infección, permitiendo una infección sistémica es mediado por algunos productos extracelulares responsable del daño local de tejidos. *P. aeruginosa* produce una o mas fosfolipasas hemolíticas homólogas, éstas hidrolizan la fosfatidilcolina y esfingomiélin y causa necrosis de tejido y muerte celular *in vivo* (Westman *et al.*, 2010). Esta bacteria también produce proteasas elastasas como la elastasa B, la cual en el músculo causa hemorragia severa y la salida de los componentes del plasma incluyendo eritrocitos y leucocitos dentro del tejido extravascular (Mims *et al.*, 1995).

Es probable que la disminución brusca de temperatura del agua del estanque a 24° C tenga un efecto depresor en las defensas de los peces, previa a la aparición de la patología en el presente lote de alevinos de doncellas, asociado a la adición de estiércol de aves al estanque, el cual es una fuente de materia orgánica, sean los

factores que han predispuerto al desarrollo en niveles importantes de esta bacteria y la infección en el presente caso. Probablemente este sea uno de los primeros casos de patologías de naturaleza infecciosa que se reporta en peces tropicales nativos de la Amazonía del Perú.



**Figura 1.** A: Alevinos de doncella con el abdomen abultado, B: Color pálido y edema en branquias, C: Líquido ascítico color sanguinolento extraído por punción de la cavidad abdominal, D: mesenterio de color sanguinolento y con abundante edema, E: Vejiga natatoria color blanco cremoso, hígado incrementado de tamaño color amarillo ámbar, intestino con contenido líquido color amarillo ámbar.



**Figura 2.** Crecimiento en agar sangre, colonias grandes de bordes irregulares con hemólisis completa. B: Crecimiento en agar Mc Conkey, colonias grandes, planas, de bordes irregulares, color amarillo pálido. C: Crecimiento en agar cetrimide, colonias coalescentes de bordes irregulares y color grisáceo, D: Crecimiento en medio TSI, reacción alcalina, sin gas ni ácido sulfhídrico.

## CONCLUSIONES

En la mortalidad de los alevinos de *Pseudoplatystoma fasciatum* se identificó un cuadro de ascitis y anemia hemolítica asociada con la infección por *Pseudomonas* sp.

## AGRADECIMIENTO

Al Sr. Felix Jara Ramírez, técnico del laboratorio de sanidad animal de la Universidad Nacional Agraria de la Selva por su incondicional apoyo en la realización de los trabajos de laboratorio y al microbiólogo Joaquín Vertiz Osoreo por su apoyo en la revisión.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Austing B.; Austin D.A. 2007. *Bacterial fish pathogens diseases of farmed and wild fish*. Fourth Edition. Springer and Praxis Publishing, UK. p. 594 pp.
- Eissa, N.M.E.; Abou El-Ghiet E.N.; Shaheen A.A.; Abbass A. 2010. Characterization of *Pseudomonas* species isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Qaroun and Wadi-El-Rayan lakes, Egypt. *Global Veterinaria* 5(2):116-121.
- Mims, C.; Dimmock, N.; Nash, A.; Stephen J. 1995. *Mim's pathogenesis of infectious disease*. Fourth Edition. Academic Press. CA. USA. 414 pp.
- Nishimori, E.; Kita-Tsukamoto, K.; Wakabayashi, H. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int. J. System. and Evolu. Microbio.* 50:83-89.
- Noga, E. J. 2000. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press, IA. 367pp.
- Smail, D.A. 1999. Viral haemorrhagic septicemia. In: Woo P.T.K; Bruno D.B. *Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal infections*. CABI publishing UK. p. 123-147.
- Quinn, P. J.; Carter, M.E.; Markey, B.; carter, G.R. 1999. *Clinical Veterinary Microbiology*. First Edition, Mosby-Elsevier Limited. UK. 648 pp.
- Walker, P.J.; Winton J.R., 2010. Emerging viral disease of fish and shrimp. *Vet. Res.* 41:51, 1-24.
- Westman, E.L.; Matewish, J.M.; Lam, J.S. 2010. *Pseudomonas*. In: Giles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, G.; Thoen, C.O. (Eds). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Fourth Edition, Blackwell Publishing, IA. USA. p. 443-468.