

Juan Martín Laborde

Juan Martín Laborde es Licenciado de Biología, Doctor en Ciencias Veterinarias, y posee una Maestría en Biología Molecular y Biomedicina. En la actualidad es Especialista en animales de laboratorio, Diagnóstico veterinario de laboratorio y desarrolla sus tareas e investigación en el control sanitario de las colonias de roedores y peces cebra que se utilizan en experimentación en la República Argentina.

El uso de peces como reactivo biológico en la investigación biomédica se ha incrementado en la última década, en gran medida liderado por el desarrollo del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) para estudiar los mecanismos de embriogénesis y enfermedades de los vertebrados. La preocupación por las enfermedades infecciosas en los peces utilizados en investigación está aumentando debido a la escasa implementación de medidas de bioseguridad adecuadas en las instituciones de experimentación y que podría conducir a una rápida propagación de patógenos.

Además de las enfermedades agudas que causan morbilidad y mortalidad severa, las condiciones crónicas subyacentes que causan infecciones de bajo grado o subclínicas, pueden confundir los resultados de la investigación, por lo tanto, se recomienda la implementación de un programa de control sanitario en las instalaciones del pez cebra, para mitigar los riesgos y asegurar que los resultados obtenidos de las investigaciones estén libres de variables no controladas.

La salud del pez cebra

Control sanitario y prevalencia de agentes patógenos de peces cebra (*Danio rerio*) en experimentación en Argentina

Juan Martín Laborde



www.elivapress.com



ELIVAPRESS

La salud del pez cebra

*Control sanitario y prevalencia de agentes
patógenos de peces cebra (Danio rerio) en
experimentación en Argentina*

La salud del pez cebra

*Control sanitario y prevalencia de agentes
patógenos de peces cebra (Danio rerio) en
experimentación en Argentina*

Juan Martín Laborde

ELIVA PRESS

ISBN: 978-99993-1-010-9

© Eliva Press Global Ltd. part of Eliva Press S.R.L., 2023

© Juan Martín Laborde

Cover Design: Eliva Press

Cover Image: Ingimage

Email: info@elivapress.com

Website: www.elivapress.com

This Eliva Press imprint is published by the registered company Eliva Press Global Ltd. part of Eliva Press S.R.L. Publishing Group

The registered company address is: Pope Hennessy Street Level 2, Hennessy Tower Port Louis, Mauritius

Eliva Press S.R.L. Publishing Group address is: Bulevardul Moscova 21, Chisinau, Moldova, Europe

No part of this book may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from Eliva Press. Any brand and product names mentioned in this book are subject to the trademark, brand, or patent protection and are trademarks of their respective owners. The use of brand names, trade names, product names, product descriptions, is in no way implies that such names may be regarded as unrestricted by trademark and brand protection laws and thus may be used by anyone. The opinions and views expressed are exclusively those of the authors/contributors and in no way the editors or publisher is responsible.

All rights reserved.

La salud del pez cebra

**Control sanitario y prevalencia de
agentes patógenos en colonias de
peces cebra (*Danio rerio*) utilizados en
experimentación en Bioterios de la
República Argentina**

Dr. Juan Martin Laborde

2023

Agradecimientos.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

A la Prof. Cecilia Carbone y el Dr. Miguel Ayala por brindar la aprobación para el inicio del control sanitario en peces de experimentación en el LAE, confiar en mí y el constante estímulo en mi formación profesional y académica.

Al Dr. Hernán Sguazza por su colaboración en este trabajo, sus consejos en las técnicas moleculares de laboratorio y la permanente y generosa solicitud.

A mis compañeros del LAE, por su generosa, continua e importante ayuda. Por las charlas, las risas, la confianza, el compañerismo y la amistad diaria.

A Belén, mi compañera de vida, por su ayuda, su apoyo y por ser una persona maravillosa con un corazón gigante.

A Tiziana mi hija, de quien estoy orgulloso, me renueva las ganas de vivir y seguir adelante todos los días.

Fernando que ya no está pero me sigue dando consejos y Sebastián, mis hermanos amigos en quienes siempre pude confiar.

A mis padres que los perdí hace tiempo pero sé que los sentimientos y emociones son como cartas para ellos.

A todos los que de alguna manera estuvieron y están siempre a mi lado.

Índice

Agradecimientos	2
Índice	3
Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	5
1. Introducción	6
1.1. Historia natural del pez cebra y biología	7
1.1.1. Desarrollo embrionario	8
1.1.2. Modelo experimental en investigación biomédica	9
1.2. Factores medioambientales, macro, microambiente y adquisición de peces	10
1.2.1. Temperatura	11
1.2.2. Oxígeno disuelto	12
1.2.3. pH	14
1.2.4. Dureza total del agua	15
1.2.5. Amoníaco, Nitritos y Nitratos	15
1.2.6. Características generales de las instalaciones de laboratorio	17
1.2.6.1. Estructurales	17
1.2.6.2. Conexiones de agua	18
1.2.6.3. Sistemas de iluminación	18
1.2.6.4. Sistemas de calefacción y ventilación	19
1.2.6.5. Tanques de agua y disposición	19
1.2.6.6. Diseño del sistema de circulación del agua	19
1.2.6.7. Incorporación de tanques o peceras centinela	21
1.2.6.8. Suministro de agua	22
1.2.7. Alimentación de los peces	23
1.2.8. Adquisición de peces	24
1.3. Manejo de la salud en las colonias del pez cebra	25
1.3.1. Interacción huésped-patógeno-ambiente	27
1.3.2. Enfermedades del pez cebra en instalaciones de investigación	29
1.3.3. Diagnóstico general y protocolos de necropsia	32
1.3.4. Anamnesis	33
1.3.5. Comportamiento	33
1.3.6. Muestras para las pruebas y eutanasia	34
1.3.7. Metodología de las pruebas	37
1.3.8. Selección de peces para la necropsia	38

1.3.9. Examen externo	38
1.3.10. Branquias	39
1.3.11. Examen interno	39
1.3.12. Improntas	39
1.3.13. Bacteriología	40
1.3.14. Virología	41
1.3.15. Biología molecular	41
1.4. Enfermedades bacterianas	42
1.4.1. Micobacteriosis	42
1.4.2. Bacterias deslizantes	45
1.4.3. Aerocistitis bacteriana (infección bacteriana de la vejiga natatoria)	47
1.4.4. <i>Edwardsiella ictaluri</i>	48
1.5. Enfermedades protozoarias	50
1.5.1. Enfermedad de terciopelo (<i>Piscinoodinium pillulare</i>)	51
1.5.2. Microsporidiosis	52
1.5.3. Enfermedad del Neón Tetra	55
1.5.4. Ich (enfermedad de la mancha blanca)	56
1.6. Parásitos Metazoos. Capillariasis	57
1.7. Myxosporidiosis renal	59
2. Control sanitario de colonias de peces cebra de bioterios de Argentina	
Fundamentación del proyecto	61
3. Hipótesis	61
4. Objetivo general	62
4.1 Objetivos específicos	62
5. Materiales y métodos	62
5.1. Muestreo	62
5.2. Procesamiento de las muestras y técnicas de diagnóstico	64
5.2.1 Microscopía óptica de campo claro (parásitos y bacterias)	64
5.2.2 Cultivo bacteriológico, aislamiento e identificación fenotípica	64
5.2.3 Técnica de PCR (parásitos y bacterias)	65
6. Resultados	67
7. Conclusión	72
8. Discusión	72
9. Bibliografía	77

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama del ciclo del Nitrógeno	17
Figura 2. Ubicación de los tanques de peces centinelas	22
Figura 3. Diagrama de interacción huésped-patógeno-ambiente	27
Figura 4. Número de peces y muestras ambientales	32
Figura 5. Mapa de colores para la detección de patógenos	37
Figura 6: Desarrollo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar cetrímide (CET)	68
Figura 7: Desarrollo de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en CET y expuesto a luz UV	69
Figura 8: Control de <i>Aeromonas hydrophila</i> por PCR y transiluminador de luz azul	69
Figura 9: Control de <i>Mycobacterium</i> spp. por PCR y transiluminador de luz azul	70
Figura 10: Control de <i>Pseudoloma neurophilia</i> por PCR y transiluminador de luz azul	70
Figura 11: Control de <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> por PCR y transiluminador de luz azul	71
Figura 12: Muestras positivas de agentes patógenos	71

Índice de Tablas

Tabla 1. Signos generales y diagnóstico presuntivo en peces cebras	29
Tabla 2. Agentes patógenos de pez cebras, clasificación y patogenicidad	30
Tabla 3. Métodos de conservación de tejidos y diagnóstico de enfermedades	42
Tabla 4. Agentes patógenos de peces cebras controlados en el LAE	63
Tabla 5. Detalle de ciclos, tamaño del producto y agentes controlados por PCR	66

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un importante modelo animal de investigación. Muchas de las mismas características que hacen de este pequeño pez de agua dulce tropical un favorito de los peces entre los aficionados en el acuarismo, también han contribuido a su surgimiento como un modelo para el ser humano desarrollo y enfermedad, toxicología, genética y comportamiento. Un factor importante en esta aparición es la relativa facilidad de mantener y criar pez cebra en cautiverio. A medida que el pez cebra se ha vuelto más frecuente en los programas de investigación con animales, hay una creciente necesidad de desarrollar estándares de atención que favorezcan el bienestar de estos animales. Dichos estándares no solo mejorarán bienestar animal, pero en última instancia servirá para mejorar la calidad y la eficacia de la investigación en que los peces están involucrados. (Spence *et al.*, 2008).

El pez cebra, es utilizado como modelo de desarrollo embrionario de vertebrados, análisis de la función génica, y mutagénesis. Previo al desarrollo del modelo del pez cebra en la década de 1970, genetistas del desarrollo experimentaban con modelos de invertebrados como *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y, más recientemente, con *Caenorhabditis elegans* (nematodo) para la investigación del desarrollo embrionario temprano. La combinación de una prolífica capacidad reproductiva de *Drosophila* y la manipulación exitosa de sus embriones permite hacer ensayos de desarrollo embrionario y análisis genético de forma práctica en el laboratorio. Sin embargo, en relación al desarrollo embrionario, la aplicación de esta información a vertebrados fue limitada. Desde embriones de ratones que se desarrollan dentro de un útero hasta la rana de garras africana (*Xenopus laevis*) tienen una capacidad reproductiva lenta, y ninguno de estos modelos de vertebrados más populares poseen las características que hizo de *Drosophila* un modelo tan práctico (Kahn, 1994; Spence *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008).

Por su alta fecundidad y fertilización externa, el pez cebra poseía los atributos de estos modelos existentes, sin sus inconvenientes inherentes. Debido a que los mecanismos moleculares fundamentales del desarrollo de un embrión son similares para todos los vertebrados, posibilitó que el pez cebra, se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior de elección (Spence *et al.*, 2008).

Los procesos de mutagénesis han permitido experimentar en áreas del genoma sin conocimiento previo de la función de genes específicos. Desde hace algunos años en los laboratorios, se utilizan ratones y ratas en técnicas donde se eliminan mutaciones de interés de genes conocidos para estudiar el efecto del gen en el fenotipo resultante. A través de la creación de fenotipos mutantes por medio de la mutagénesis química, las

funciones de muchos genes asociados a la pigmentación, tejido muscular, cardiovascular y el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) han sido investigados extensivamente (Driever *et al.*, 1994; Postlethwait *et al.*, 1997). A principios de la década de 1970, George Streisinger (Universidad de Oregon), un genetista de fagos, identificó al pez cebra como un modelo de vertebrado. Para aislar mutaciones genéticas en pez cebra utilizó protocolos de mutagénesis. Esta línea sistemática de trabajo ha continuado en la Universidad de Oregón por varios laboratorios, incluido el de Charles Kimmel, quien también ha aportado gran parte de la información, involucrando el desarrollo embrionario temprano del pez cebra. A comienzo de la década de 1990, dos laboratorios (Christiane Nusslein-Volhard del Instituto Max Planck para el Desarrollo Biología y Wolfgang Driever del Hospital General de Massachusetts), comenzaron a utilizar una metodología llamada "mutagénesis de saturación" para identificar fenotipos mutantes en el pez cebra (Kahn, 1994). Los investigadores, usando esta metodología, trataron a los machos adultos de pez cebra con un mutágeno químico, y se examinó la generación F3 para observar anomalías del desarrollo por la interrupción de la función de varios genes podrían identificarse mediante la observación de los fenotipos mutantes en los peces cebra en desarrollo. En 1996, esta metodología había producido más de 2000 mutaciones en varios cientos de genes que son necesarios para el desarrollo embrionario normal (Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996). En 1994, John Postlethwait. (Universidad de Oregón) publicó el primer mapa genético donde se identificaron aproximadamente 400 marcadores genéticos. Por 1996, el mapa genético del pez cebra ya había crecido para incorporar aproximadamente 1200 marcadores (Postlethwait *et al.*, 1997).

El pez cebra es tolerante a una amplia gama de condiciones ambientales condiciones y fácilmente reproducirá y producirá grandes cantidades de descendencia, incluso bajo condiciones variables o subóptimas. Irónicamente, el hecho de que el pez cebra prospere tan bien en cautiverio ha permitido a los investigadores pasar por alto la importancia de desarrollar estándares para el cuidado y manejo, basado en la biología y comportamiento de estos animales (Spence *et al.*, 2008).

1.1. HISTORIA NATURAL DEL PEZ CEBRA, BIOLOGÍA Y MODELO EXPERIMENTAL EN INVESTIGACION BIOMEDICA

El pez cebra es una especie de agua dulce nativa del Ganges, río de la India y se extiende a otras áreas continentales circundantes del sur de Asia (Hamilton-Buchanan, 1822). El pez cebra es un miembro de la familia Cyprinidae, que incluye el género Danios. Los adultos no suelen superar los 3 - 4 cm de longitud, son sexualmente dimorfos

y la hembra es un poco más grande, más plateada y ligeramente redondeada; en cambio el macho es más aerodinámico y generalmente más brillante que las hembras. Los adultos sanos suelen ser un tono plateado o dorado (menos común) con varias rayas horizontales de color azul / púrpura brillante que se extienden desde el opérculo hasta la base de la aleta caudal. Las rayas de colores se repiten con frecuencia tanto en la aleta anal como en la dorsal. Los machos que exhiben comportamiento dominante sobre los demás peces del acuario, generalmente muestran tonos dorados o amarillos más brillantes y dorsalmente, es evidente un tono marrón amarillento oscuro a oliva desde la cabeza a la aleta caudal. La región ventral suele ser homogénea, de tono amarillo-blanco y dos pares de bárbulas están presentes en la mandíbula inferior.

La cría selectiva por el comercio de acuarios ha producido muchas variedades fenotípicas, incluyendo peces con aletas en velo y aletas largas.

El pez cebra no suele ser agresivo y es un nadador activo ocupando los estratos superiores de la columna de agua. Son omnívoros y han demostrado ser bastante resistentes y prolíficos cuando son criados en cautiverio. A través de una buena nutrición y por manipulación del ciclo luz-oscuridad, las hembras pueden ser inducidas fácilmente a tener crías en el laboratorio. Después de un período de oscuridad total, la repentina aparición de luz genera un comportamiento de frotamiento persistente en la hembra por parte del macho quien la estimula para la postura de huevos, los cuales caen en la cámara colocada en la parte inferior del acuario. Después de inducir a la hembra para la liberación de huevos a través del comportamiento táctil, los machos fertilizan rápidamente los mismos. Para la protección de los huevos se requieren pequeñas esferas de vidrio (cánicas) colocadas en la parte inferior de la unidad, evitando que los adultos consuman sus posturas antes de la recolección (Dietrich *et al.*, 1999^a; Spence *et al.*, 2007).

1.1.1. Desarrollo embrionario

Después de la fertilización, el embrión de pez cebra sufre una serie de formación de escisiones visibles. En 28.5 °C (la temperatura estándar para el mantenimiento del pez cebra) la primera ocurre a los 45 minutos después de la fertilización, y las siguientes ocho divisiones tienen lugar a intervalos regulares de 15 minutos. Después de la novena división, el ciclo celular comienza a alargarse y las divisiones celulares se vuelven asíncronas. Esto marca el inicio de la formación de la médula ósea (FMO) en alrededor de 3 horas después de la fertilización. Un aspecto importante de la FMO es la activación de la transcripción cigótica en donde todos los procesos, están regulados por factores maternos depositados en el huevo. La gastrulación, proceso por el cual las tres capas

germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) ocupan sus posiciones finales en el embrión, comienza después de aproximadamente 5.5 horas posteriores a la fertilización (hpf) y se completa a las 10 hpf. Desde las primeras divisiones no se bisecta la yema, el embrión se asienta como una bola de células en la parte superior de la yema hasta aproximadamente 4.5 hpf, cuando las células embrionarias comienzan a crecer extendiéndose sobre la yema. Este proceso, denominado "*epiboly*", (es un movimiento celular que se produce en el embrión temprano, al mismo tiempo que la gastrulación) y se completa a las 10 hpf. Durante el período comprendido entre 10 y 24 hpf, los órganos internos comienzan a formarse, y en los cambios morfológicos las estructuras adultas se vuelven detectables. A las 24 hpf el corazón late, la sangre comienza a circular y el embrión responde a cualquier estimulación denotando la presencia de conexiones neuromusculares. Durante los próximos días el embrión sigue creciendo y los órganos internos completan su desarrollo. Los embriones comienzan a alimentarse poco después el día 4 o 5 (Kimmel *et al.*, 1995; Spence *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2008).

1.1.2. Modelo experimental en investigación biomédica

El pez cebra se ha utilizado como modelo experimental en varios campos de la investigación biomédica (Streisinger *et al.*, 1981), pero solo recientemente se utiliza principalmente como modelo en biología del desarrollo. Sin embargo, los procesos biológicos relevantes para un organismo adulto también se pueden abordar (por ejemplo, homeostasia) Jagadeeswaran & Liu, 1997. Las principales investigaciones utilizando el pez cebra se han realizado en desarrollo temprano y organogénesis, pero también en una amplia variedad de ensayos biológicos (Dietrich, 1999a, 1999b; Rubinstein, 2003; Weinstein *et al.*, 1995; Speedie & Gerlai, 2008).

La utilidad del pez cebra como sistema modelo no depende solo en sus rasgos compartidos con otros animales y humanos, sino también en varias características que permiten una variedad de experiencias y enfoques. El pez cebra adulto es pequeño, lo que hace posible mantener un número mayor de peces que de otros vertebrados, como pollos o ratones, en un determinado espacio. Además, el pez cebra requiere poco mantenimiento, a excepción de cambios de agua y alimentación pero estos pueden ser automatizados para facilitar la tarea. Esto hace del mismo una opción muy económica como organismo modelo. La hembra del pez cebra pone habitualmente un par de cientos de huevos, y es posible volver a cruzar los progenitores a intervalos semanales. Los grandes tamaños de las camadas son importantes para los experimentos genéticos y también al proporcionar un gran número de embriones para ensayos moleculares y

bioquímicos como una población bien sincronizada en su rápido desarrollo ontogenético de solo tres días hasta llegar al estadio de alevino. Los embriones o alevinos de pez cebra se desarrollan fuera de la madre y poseen una yema que los nutre durante varios días. Esto significa que todas las etapas de desarrollo son accesibles para la experiencia, sin sacrificar a la madre, como a menudo se necesita en otras especies de vertebrados para obtener embriones que se desarrollan en el útero. Los embriones son ópticamente transparentes, que permite observar células en el embrión vivo. Los embriones de pez cebra se desarrollan muy rápidamente, y 24 horas después de la fertilización los embriones tienen una apariencia de pez con la mayoría de los sistemas de órganos ya desarrollados y funcionando. Entonces aquellos experimentos que involucran el desarrollo de un sistema orgánico específico (por ejemplo, expresión transitoria de un gen particular) es posible obtener resultados en uno o dos días a partir del inicio de desarrollo del embrión.

El genoma del pez cebra es aproximadamente la mitad del tamaño del que posee un mamífero, así la generación de mapas físicos y posicionales para proyectos de clonación en el pez cebra requieren esfuerzos similares a los de un ratón. El pez cebra alcanza la madurez sexual en un tiempo relativamente corto (2-4 meses, dependiendo de la densidad de peces y la tasa de alimentación). En conjunto, estas características permiten la utilización del pez cebra para realizar investigaciones en una variedad métodos y de factores embrionarios, moleculares y genéticos (Dietrich, 1999a, 1999b; Larson *et al.*, 2005; Paull *et al.*, 2010).

1.2. FACTORES MEDIOAMBIENTALES IMPORTANTES PARA LA SALUD, MACRO, MICROAMBIENTE Y LA ADQUISICIÓN DE PECES

Los peces son el grupo de animales vertebrados más numeroso y variado del planeta, con cerca de 35.000 especies conocidas. Se encuentran en todo tipo de ecosistemas acuáticos, adaptándose evolutivamente a los ambientes en los que habitan. Además, existen pruebas científicas que demuestran su capacidad para sentir miedo, dolor, angustia y estrés (Schreck *et al.* 2016, Sneddon & Brown, 2020), confirmando que son seres sintientes que necesitan condiciones óptimas de bienestar para proporcionar una cría adecuada. Se trata de emplear prácticas apropiadas que mejoren las condiciones de vida de los peces, faciliten durante las experiencias, una muerte sin sufrimiento, y reduzcan cualquier riesgo que, siendo claramente perjudicial para su bienestar, pudiera ser evitado (Fife-Cook & Franks 2019, Kristensen *et al.* 2020).

1.2.1. Temperatura

La temperatura es de importancia crítica en la supervivencia, desarrollo, crecimiento y reproducción exitosa del pez cebra. Cuando la temperatura del agua sube o baja bruscamente, los peces al igual que la mayoría de los poiquiloterms, muestran una reacción de shock interno. La magnitud de este efecto depende de la rapidez del cambio de temperatura. Como regla general, un cambio de temperatura debe limitarse a ± 1.5 °C/día, aunque muchos organismos acuáticos pueden tolerar grandes cambios de temperatura bastante bien, después de un shock inicial y un breve período de aclimatación. Las siguientes generalizaciones pueden ser útiles para el desarrollo de prácticas de laboratorio que promuevan la buena salud de los animales.

La temperatura óptima para el pez cebra es de 24-28°C y se recomienda temperaturas más altas para estimular la postura de huevos / comportamiento reproductivo y para facilitar el desarrollo de embriones fertilizados. Un cambio de temperatura afecta la tolerancia a otros factores. El aumento de la temperatura (dentro del rango de tolerancia) acelera el metabolismo y aumenta la demanda de oxígeno. Como regla general, la tasa metabólica se duplica por cada 10°C de aumento en la temperatura. Las larvas suelen ser menos tolerantes a los cambios de temperatura que sus respectivas formas adultas. En el mantenimiento del soporte vital, un sistema a temperaturas ligeramente más bajas en el laboratorio, aumentará el oxígeno disponible, reducirá la necesidad de alimento y minimizar las pérdidas debidas a incrementos accidentales de temperatura. Sin embargo, las temperaturas más bajas disminuirán la tasa de crecimiento y desarrollo. Los límites de tolerancia a la temperatura son altamente variables entre poblaciones y entre temporadas. El cambio en la temperatura (en general un aumento en la misma) es a menudo un factor en la iniciación de la actividad reproductiva u otra actividad inducida por hormonas (Larson *et al.*, 2005; Paull *et al.*, 2010; Saraiva *et al.* 2022b).

La temperatura del sistema de agua debe ser monitoreada y registrada diariamente por la colocación de un termómetro o sonda en cada sistema independiente. Pequeños cambios en la temperatura en el agua del acuario ya sea por encima o por debajo del rango óptimo no suele ser perjudicial. Sin embargo, los cambios repentinos y grandes en la temperatura (también ambiental) pueden causar un choque e incapacitar a los peces cebra.

La temperatura ambiente de la habitación debe mantenerse al menos 1°C por encima de la del sistema de contención de agua (acuario o pecera). La ventilación en la sala ayuda a prevenir la condensación de agua en las superficies externas de acuarios, paredes y suelo. La condensación en estas superficies sirve como un medio para el crecimiento de

mohos u hongos y genera un impacto negativo en la calidad del aire. Temperaturas ambiente superiores a 27°C generalmente no se recomiendan debido al elevado costo de mantenimiento y menor tasa de oxígeno disuelto y mayores tasas metabólicas de los peces. Pez cebra, en su ambiente natural, posee un amplio rango de tolerancia a los cambios de temperatura, en las regiones donde habita se han registrado fluctuaciones de temperatura desde los 14,2°C hasta los 33°C (López-Olmeda & Sánchez-Vázquez, 2011). Los registros de temperatura fluctúan dependiendo de la estación del año, en invierno puede alcanzar 6°C y en verano hasta 38°C (Spence *et al.*, 2008). Es un pez ectotermo, lo que quiere decir que es capaz de adaptarse a los cambios de temperatura del ambiente (López-Olmeda & Sánchez-Vázquez, 2011). Esta capacidad le permite tolerar las fluctuaciones de temperatura y aclimatarse con facilidad (López-Olmeda & Sánchez-Vázquez, 2011). La exposición de larvas de pez cebra a temperaturas variadas gradualmente, en condiciones de laboratorio, genera una mejor respuesta de adaptación en comparación a larvas expuestas a cambios bruscos de temperatura (Long *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). El cambio de temperatura genera efectos a nivel fisiológicos en los peces, afectando el desarrollo, crecimiento, metabolismo entre otros (López-Olmeda & Sánchez-Vázquez, 2011). En el caso de pez cebra, los estudios disponibles se enfocan en identificar y estudiar los efectos provocados por los cambios de temperatura a nivel transcripcional en estadios larvales (Long *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2013), y cómo influyen los cambios de temperatura en estadios embrionarios (Scott & Johnston, 2012). Adicionalmente, en el trabajo de Schaefer & Ryan, 2006 evalúan el concepto de plasticidad de desarrollo el cual se define como cambios fenotípicos permanentes generados en respuesta a cambios en las condiciones ambientales durante el crecimiento (Kinne, 1962).

1.2.2. Oxígeno disuelto

En el agua, un pez se asfixia cuando el contenido del oxígeno disuelto cae por debajo de un nivel crítico. Este nivel es específico de la especie y de la cepa sujeta a adaptación y dependiente de la temperatura.

Cuando un pez es sacado del agua, las laminillas branquiales se colapsan porque carecen de soporte esquelético interno. Esto reduce en forma drástica el área de superficie disponible para la difusión del oxígeno y el pez morirá finalmente de asfixia a menos que sea devuelto al agua. Por lo tanto, la duración del tiempo de permanencia fuera del agua debido al muestreo periódico para experimentos o al transferir los animales deben ser lo más breve posible. Los peces evitan las áreas donde se produce el

agotamiento de oxígeno. Esto puede ser de ayuda en la identificación de áreas deficientes de oxígeno dentro de los sistemas de agua. Por el contrario, gran cantidad de peces que se reúnen alrededor de los aireadores, piedras de aire u otros puntos de suministro de aire indican un grave agotamiento de oxígeno dentro del sistema; como también peces reunidos en la superficie del agua indica una falta de saturación de oxígeno (Saraiva *et al.* 2022b). Este comportamiento se produce porque la saturación del oxígeno del agua es ligeramente mayor en la interfaz aire-agua. Aunque una adecuada oxigenación es esencial, demasiado oxígeno u otros gases comprimidos, disueltos como el nitrógeno, pueden ser perjudiciales e incluso fatales si no se corrige rápidamente. Una masiva aireación puede producir nubes de burbujas muy finas (Stoskopf, 1993). Bajo una alta presión de una bomba de aire, los gases comprimidos tienden a permanecer en solución. Una vez expulsado al sistema de circulación de agua, el gas comprimido sale de solución a menor presión y es utilizado por los peces del acuario. Esto resulta en émbolos aéreos que se desarrollan en los vasos sanguíneos más pequeños, como en las laminillas branquiales y que interrumpen el flujo de sangre a través de las branquias o en algunos de los casos pueden romper los vasos delicados, y que resulta en una hemorragia, asfixia y muerte. Esta condición se conoce como enfermedad de la burbuja de gas (*Gas Bubble Disease*, GBD) y con frecuencia se manifiesta en los peces como una dificultad para respirar (boca abierta), hemorragia alrededor de las branquias, exoftalmia, pequeñas burbujas de aire asociadas con las escamas o córnea, y muerte súbita. El diagnóstico de GBD puede ser difícil a menos que a los peces afectados se les realice una necropsia poco después de la muerte. Lesiones abiertas asociadas a GBD frecuentemente se vuelven inaparentes después de 24 horas postmortem. GBD debe remediarse rápidamente mediante la eliminación de todos los dispositivos de aireación (piedras de aire, etc.) secundarios que contribuyen a agregar más gas a presión para el agua. Esto reducirá la mezcla de gases disueltos en el sistema de agua. La mayoría de los casos de sobresaturación de gases se puede atribuir directamente al aire atrapado en el sistema de tuberías a través de equipos defectuosos o envejecidos, tales como tuberías, juntas o accesorios de manguera que generalmente se encuentran en la succión cercana a la bomba. La sobresaturación de gas del sistema de agua puede también ocurrir en cualquier lugar que pueda permitir que el aire entre y permanezca en el sistema bajo aumento de presión. La cavitación del agua o el aire atrapado en la bomba es una causa frecuente en la precipitación de la sobresaturación del gas y en ocasiones se puede diagnosticarse escuchando el funcionamiento de la bomba el aire atrapado dentro del sistema de la bomba y que generalmente resulta en un ruido de

"burbujeo". Los componentes defectuosos que producen fugas de aire deben ser Identificados, reparados o reemplazados. Con frecuencia, los sistemas operativos necesitan ser modificados para evitar la colocación de piedras de aire cerca de la entrada de la bomba. Nunca debe permitirse que una bomba funcione sin agua o ingreso aire durante los cambios de agua. La aireación se puede proporcionar en acuarios o recipientes poco profundos, simplemente manteniendo una circulación del agua. La difusión de oxígeno es adecuada a profundidades menores a 10 cm si el aire es bombeado a una velocidad de 2 litros / min por cada 100 litros de agua del sistema. Una menor capacidad se puede utilizar si los peces están inactivos o la temperatura del agua se encuentra en el umbral inferior de tolerancia térmica para esa especie o cepa del diseño experimental. El aire comprimido es caliente y seco y tiende a acelerar la evaporación del agua dentro del sistema. El aire que burbujea en los acuarios producirá una niebla fina que puede transportar fomites y ayudar en la transmisión de enfermedades. Dicha humedad también puede resultar en la oxidación de componentes metálicos que resulta en una posible acumulación y aumento de los niveles de iones metálicos que pueden ser tóxicos. Por lo tanto, todos los componentes metálicos de acero inoxidable deben ser regularmente controlados y evitar la formación de óxido (Stoskopf, 1993; Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007).

1.2.3. pH

El pez cebra, como la mayoría de las especies de agua dulce, prefiere un rango de pH de 6.8-7.2 y con un óptimo de pH 7.0. Al igual que con la temperatura, los cambios fuera del rango óptimo, como cambios repentinos y drásticos en el pH puede ser muy perjudicial para la salud animal. Un pH más alto (> 8.0) también resulta en una concentración más alta de amoníaco no ionizado (NH₃). Mientras que pH bajo (<5.0) inhibe la actividad de las bacterias nitrificantes y se tiende a aumentar los niveles totales de amoníaco debido a una acumulación del mismo. En sistemas de agua cerrados y recirculantes, el pH irá gradualmente en disminución debido a la producción de ácidos durante el proceso de nitrificación ya que las bacterias dentro del biofiltro convierten el amoníaco en nitrato. El pH también disminuirá en sistemas mal aireados debido a la producción y acumulación de dióxido de carbono (CO₂) creado por la respiración de los peces.

El pH del sistema de agua tiene una influencia directa sobre la susceptibilidad de los peces a las toxinas contaminantes metálicas comunes como el zinc, el cobre, el hierro y el aluminio que son más solubles en agua en condiciones ácidas. Por lo tanto, la toxicidad asociada con la exposición a estos elementos es más común en sistemas de

agua mantenido a un valor de pH más bajo ((Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007; Kwong *et al.*, 2014; Saraiva *et al.* 2022b).

1.2.4. Dureza total del agua

La cantidad de sales de calcio y magnesio en el agua se denomina como dureza del agua. Otros cationes también contribuyen a la dureza total del agua, pero estas suelen estar presentes sólo en cantidades muy pequeñas dentro de agua dulce normal. Los kits de prueba comerciales disponibles tienden a medir la dureza como la cantidad de carbonato de calcio (CaCO_3) presente en el agua. Los informes de calidad del agua generalmente expresan niveles de dureza en términos de partes por millón (ppm) o miligramos por litro (mg / litro). El pez cebra es generalmente considerado como una especie de agua "dura" con niveles óptimos de calcio y magnesio entre 80 y 200 ppm. El agua muy suave (0-10 ppm) puede ser perjudicial para las crías en desarrollo, ya que dependen del agua para la captación de minerales esenciales durante las primeras fases del crecimiento. También se ha encontrado que una baja dureza del agua o niveles de calcio está asociado con bajas tasas de supervivencia de embriones y mayor susceptibilidad a otras enfermedades inducidas por el medio ambiente como resultado de una mala calidad del agua (Stoskopf, 1993).

Cuando se utiliza ósmosis inversa (RO) o agua destilada en un sistema de acuarios, los minerales que han sido eliminados por el proceso de filtración necesitan ser adicionados. El calcio se puede añadir al agua en forma de CaCO_3 o preparaciones de coral triturado (Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007 Gonzalez *et al.*, 2005).

1.2.5. Amoníaco, Nitritos y Nitratos

Una comprensión profunda de los principales insumos ambientales y microorganismos ubicuos que metabolizan proteínas para los subproductos nitrogenados a través del ciclo del nitrógeno son esenciales en la evaluación o interpretación de los niveles de amoníaco (NH_3), nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3) dentro de un sistema de agua.

En el ciclo del nitrógeno o nitrificación, una población mixta de bacterias se desarrolla dentro del biofiltro del sistema. En un funcionamiento completo, el biofiltro debe ser capaz de convertir todo nitrógeno tóxico y residuos producidos dentro de un sistema cerrado en subproductos no tóxicos. Los alimentos no consumidos, en descomposición y la excreción de los peces son las principales fuentes de nitrógeno en forma de amoníaco dentro del sistema. El amoníaco se convierte primero en nitrito por *Nitrosomonas* spp. que son bacterias presentes en el biofiltro. Luego el nitrito es convertido en nitrato por la

acción de *Nitrobacter* spp. que son bacterias y flora normal del biofiltro establecido (Figura1). Aunque estas bacterias son las principales responsables de la conversión de amoníaco a nitrato, otras especies bacterianas, incluyendo los heterótrofos potencialmente oportunistas, tales como *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp., contribuyen también a la conversión de residuos nitrogenados. Por ende estas bacterias son también componentes integrales de la flora normal de los peces y son constantemente aportados en el biofiltro mediante la excreción de los peces. Es importante entender que el biofiltro es una población dinámica de muchas especies de bacterias que tienen un impacto significativo sobre la calidad del agua y posteriormente, la salud de los peces. Cualquier cambio abrupto en el medio ambiente acuático puede afectar negativamente a las bacterias dentro del biofiltro. La incorporación de un gran número de peces demasiado rápido o el tratamiento del agua con agentes químicos (incluidos los antibióticos) en forma injustificada, con frecuencia pueden dar como resultado un desbalance en el equilibrio de la flora bacteriana dentro del biofiltro. Por lo tanto, las poblaciones de bacterias dentro del biofiltro pueden alterarse en forma significativa y repentina mediante cambios en el pH del agua y niveles de amoníaco, nitrito y frecuentemente de nitrato. Mientras que los niveles altos de amoníaco o nitrito son muy tóxicos, el de nitrato es relativamente no tóxico. Sin embargo, mantener bajo el nivel de nitrato dentro del sistema es importante para garantizar la salud del biofiltro y para controlar el crecimiento de algas. En este sentido los cambios periódicos de agua son esenciales para evitar la acumulación de nitrato y otros metabolitos tóxicos en el medio ambiente acuático. Sin embargo, los biofiltros también pueden alterarse cambiando el agua del sistema con demasiada frecuencia o cambiando también se realiza con un gran volumen de agua durante un intercambio de agua programado. Los cambios de agua también pueden alterar la dinámica de un biofiltro por una mezcla demasiado fuerte, que desaloja las bacterias del sustrato (Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007; Gonzalez *et al.*, 2005).

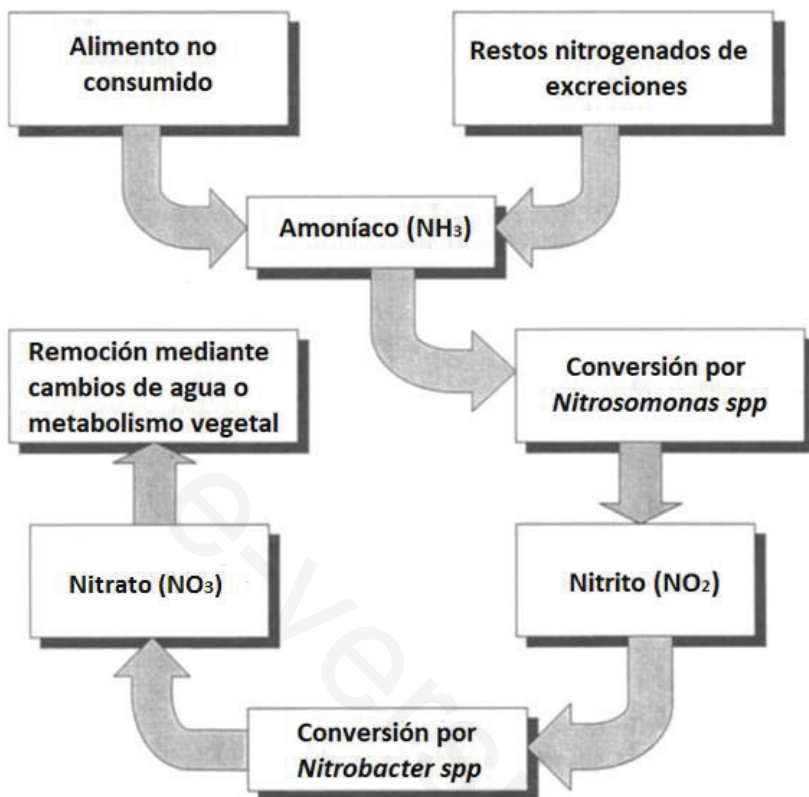


Figura 1. El ciclo del nitrógeno. Los alimentos en descomposición y la excreción de desechos nitrogenados son las fuentes principales de amoníaco. El amoníaco tóxico se convierte en nitrito por *Nitrosomonas* spp. El nitrito tóxico se convierte luego en nitrato relativamente no tóxico por *Nitrobacter* spp. El nitrato se acumula dentro del agua a menos que se elimine por cambios regulares de agua o por metabolismo de plantas residentes. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00020-1>

1.2.6. Características generales de las instalaciones

1.2.6.1. Estructurales

Revestimientos de paredes, tratamientos para pisos, umbrales de puertas y techos debe ser de materiales impermeables al agua o resistentes al agua según sea necesario. Suelos revestidos de epoxy. Las paredes ofrecen las ventajas de un fácil saneamiento y resistencia al agua. Las puertas deben tener desniveles para prevenir posibles fugas de agua (Maierdiyali *et al.*, 2020).

1.2.6.2. Conexiones de agua

Sólo se debe utilizar un sellador de silicona de "grado alimenticio", para evitar la introducción de lixiviados químicos potencialmente tóxicos. El cobre debe evitarse en los conductos y las uniones como también soldaduras a base de plomo. Las salas deben estar provistas de un drenaje adecuado. Esto puede requerir un piso con desagües en varios lugares evitando un ángulo de caída pronunciado de drenaje porque crea una base inestable para racks pesados de acuarios. Las descargas de agua con agentes infecciosos no deben ser descargadas en aguas superficiales. Si el agua de salida debe conectarse a las líneas sanitarias con un proceso anterior de desinfección adecuado con cloro o un tratamiento con ozono y filtros de partículas (Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007; Maierdiyali *et al.*, 2020).

1.2.6.3. Sistemas de iluminación

El fotoperiodo es de importancia crítica en el mantenimiento de la salud fisiológica / ambiental normales en sistemas acuáticos. Es apropiado unas 12-16 horas de luz por día suministradas por luz natural o artificial (luces fluorescentes). Las habitaciones deben estar equipadas con una iluminación cenital con control de temporizador. Dependiendo del protocolo, el control del fotoperiodo se realiza ya sea por el control de la iluminación de la sala o por temporizadores en los acuarios individuales. En instalaciones más grandes con múltiples sistemas de rack modulares que se extienden desde el suelo hasta el techo, se debe prestar atención a la disposición de la iluminación para asegurar que penetre la luz en forma adecuada a todos los tanques o acuarios que contienen peces, especialmente los que se encuentran en la parte inferior (cerca del suelo) del sistema de estanterías. Por el contrario, los peces alojados en la parte superior de los estantes y demasiado cerca de la fuente de luz pueden recibir mucha intensidad luz y ambas circunstancias no son favorables. Entonces demasiada o muy poca intensidad lumínica puede influir negativamente en la actividad reproductiva de los peces dentro de la colonia. En estas instalaciones con estanterías tipo rack, las unidades, los accesorios de iluminación fluorescente deben estar dispuestos en paralelo a las filas de estanterías y por encima y al medio de los pasillos entre dos unidades de estanterías. Esta disposición maximiza la penetración de la luz para peces alojados en todos los niveles de la estantería (Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007).

1.2.6.4. Sistemas de calefacción y ventilación

En la aireación del agua del sistema, el aire comprimido debe ser filtrado y protegido de contaminantes en el ambiente. El aire de baja o media presión debe ser canalizado adecuadamente a todos los acuarios o tanques del sistema o rack. Las conexiones deben ser plásticas de cloruro de polivinilo (PVC) con accesorios para tubos del mismo material y con difusores de aire en la porción terminal de la conexión. El control de humedad debe ser considerado para todas las salas de acuarios ya que un gran número de acuarios que contienen agua en aproximadamente 25°C puede producir un grado significativamente alto de humedad, especialmente durante los meses de verano. La circulación escasa de aire en las salas y la alta humedad pueden provocar una proliferación significativa de hongos dentro de las instalaciones (Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007).

1.2.6.5. Tanques de agua y disposición

La disposición del tanque debe ser considerada cuidadosamente en términos de distribución de pesos y materiales de construcción. Un estante estándar de 40 acuarios de (1600 litros en total) llenos a capacidad pesa casi 2 toneladas. Los soportes deben ser de plástico o metal de alta resistencia y los ángulos de aluminio o acero pintado / tratado. Los soportes de madera deben evitarse ya que tienden a absorber la humedad, albergan microorganismos y no pueden ser desinfectados rutinariamente y eficazmente. Las maderas tratadas también deben evitarse debido a lixiviados tóxicos que contaminan el sistema de agua. Incluso bien sellados los soportes de madera tratada tienden a degradarse con el tiempo en un ambiente húmedo y de alta temperatura (Harper & Lawrence, 2010; Lawrence, 2007; Maierdiyali *et al.*, 2020).

1.2.6.6. Diseño del sistema de circulación del agua

El diseño del medio acuático dentro del laboratorio debe ser un aspecto importante al establecer o renovar instalaciones de pez cebra. La sanidad animal, mantenimiento, costos del sistema, y los usos de los animales deben ser factores considerados al diseñar una instalación. El enfoque modular del sistema de soporte vital (rack de circuito cerrado de agua) para el diseño de instalaciones parece ofrecer las mejores ventajas. Estos sistemas permiten la implementación de protocolos integrales de gestión sanitaria ya que implica un fácil acceso y control de animales, enfermedades, vigilancia, mantenimiento del sistema y posible expansión de la instalación como la necesidad de más animales si fuese necesario. Los sistemas modulares vienen en una variedad de tamaños y pueden

ser independientes o montados en la pared. Los sistemas modulares personalizados también pueden ser diseñados y contruidos si existen limitaciones de alguna índole o para una investigación adecuada en donde las especificaciones de diseño es una necesidad. La mayoría de los sistemas son sistemas de recirculación de agua totalmente cerrados que incorporan sistemas mecánicos, biológicos y químicos (Figura 2). Existen opciones de filtración dentro de la construcción modular pues permite un fácil acceso a todos los filtros y componentes mecánicos para sustitución rutinaria o servicio, así como en el caso de fallo de filtrado del sistema. Dentro de cada sistema de rack modular, los peces están alojados en unidades de contención llamados tanques, peceras, etc. Estos contenedores pueden alojar entre 6 a 12 peces cebras por litro y suelen estar compuestos de plástico o acrílico transparente de alto impacto que permite una fácil limpieza y visualización de los animales. Los contruidos en policarbonato parece ser la mejor opción pues los de acrílico con frecuencia presentan deformaciones con la edad y uso repetido. Un número limitado de fabricantes ahora están produciendo unidades de contención que pueden ser autoclavados. Algunas unidades también emplean un diseño de autolimpieza que elimina los alimentos no consumidos y las heces de la unidad a través del ducto de efluentes. En este diseño de sistema, se crea una corriente direccional por las vías de entrada y salida y un deflector en la parte posterior de cada tanque individual. Si bien esta opción minimiza la rutina, mantenimiento y limpieza, se debe tener cuidado para asegurar que un pez cebra más pequeño no es barrido inadvertidamente en el flujo de salida. Los sistemas modulares de soporte vital parecen ser los más prácticos y la elección económica en la mayoría de las circunstancias. Sin embargo, los tanques o peceras de 40 o más litros siguen siendo útiles en la investigación de laboratorio. En estudios de infección experimental que requieren tanques o peceras independientes, es posible mantener aislada la enfermedad en desafíos de estudios que no involucran gran cantidad de animales pero sí que involucran múltiples parámetros ambientales a medir. También son muy útiles como unidades de cuarentena o "tanque de tratamiento" de peces aislados del resto de la instalación.

Las bombas o una fuente de circulación de agua debe acondicionarse dependiendo del volumen de agua a desplazar y números de tanques o peceras del sistema. Todos los días, aproximadamente un 5-10% del volumen total de agua en un sistema de recirculación de agua se debe drenar y reemplazar. Esta entrada de un volumen de agua nueva diariamente ayuda a asegurar el mantenimiento de una adecuada saturación de oxígeno, minimiza acumulación de residuos nitrogenados, y reemplaza importantes compuestos de oligoelementos. Antes de introducir nuevos volúmenes de agua desde un

tanque de depósito hasta el sistema, el pH y la temperatura del agua debe ser equilibrada pues la adición de grandes volúmenes de agua inadecuadamente amortiguada o agua de una temperatura inadecuada puede alterar dramáticamente la química del agua e inducir un shock en los peces residentes. El agua de reemplazo debe estar ubicada en la misma habitación con temperatura controlada para evitar diferenciales de temperatura (Kent, *et al.* 2011; Kent *et al.* 2014; Maierdiyali *et al.*, 2020; Hammer, 2020).

1.2.6.7. Incorporación de tanques o peceras centinela

Un componente clave para cualquier gestión integral de la salud o programa de seguimiento del estado de salud animal es el mantenimiento de animales "centinelas" dentro de cada sistema de agua modular. Es práctico cuando se utilizan animales valiosos que no desean sacrificarse o utilizar un número menor de animales en los controles sanitarios. Estos animales (15 peces aproximadamente) ocupan un tanque post filtración que recibe el mismo agua que cada tanque de la colonia principal y permite un control del sistema de filtración y desinfección y otro con la misma cantidad de peces en una ubicación pre filtración que recibe agua del depósito de agua sucia o efluente del sistema donde los peces quedan expuestos con mayor oportunidad de infectarse en caso que hubiere un agente patógeno en la colonia (Figura 2). Para propósitos de monitoreo del estado de la enfermedad, estos animales pueden ser evaluados rutinariamente (deben estar un mínimo de tres meses expuestos e ideal si son seis meses) para varios patógenos potenciales para que los animales (transgénicos) dentro del sistema podrían haber sido expuestos. Dado que estos animales centinela han sido expuestos a las mismas condiciones ambientales que los peces de estudio, el uso de valiosos animales transgénicos para la vigilancia de enfermedades de rutina y el diagnóstico en caso de un brote de enfermedad es eliminado. Algunos animales centinela deben ser sometidos al entorno del sistema de agua durante largos períodos de tiempo para asegurar la adecuada exposición a patógenos potenciales con un inicio crónico, subclínico o insidioso de la enfermedad, como ser por ejemplo, *Mycobacterium spp* (Kent *et al.*, 2011; Kent *et al.*, 2014).

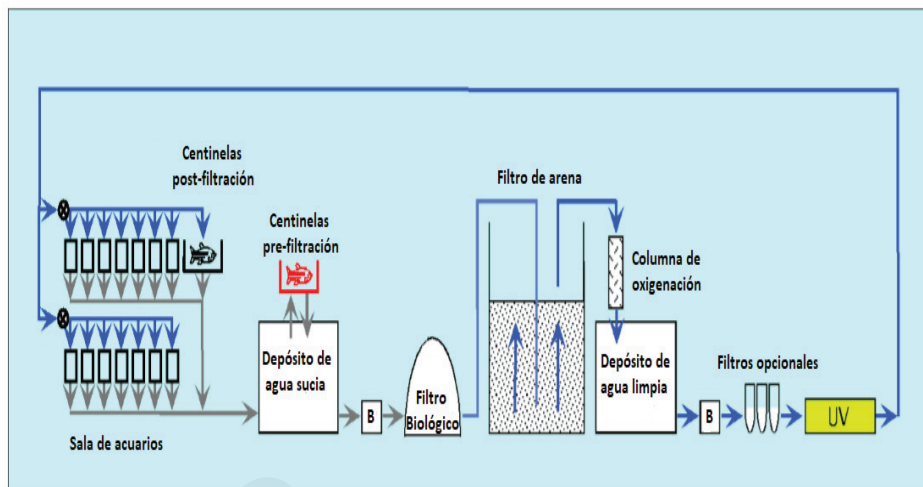


Figura 2. Ubicación de los tanques de peces centinelas (pre y posfiltración) en el diagrama de un sistema de mantenimiento de peces. DOI: 10.1089/zeb.2015.1206

1.2.6.8. Suministro de agua

La fuente de agua para una instalación debe ser considerada cuidadosamente. Idealmente, los pozos profundos son la mejor fuente de agua dulce porque contienen pocos agentes infecciosos y químicos tóxicos como aguas residuales o compuestos agrícolas. Aunque en la mayoría de los casos, se utiliza agua corriente que debe ser tratada para la eliminación de agentes como el cloro, el cobre y las cloraminas que son tóxicos para los peces.

La destilación y ósmosis inversa se pueden utilizar dentro de la instalación acuática. La ventaja del uso de estas fuentes de agua es la pureza mediante la eliminación de sustancias químicas tóxicas y microorganismos contaminantes. Sin embargo, estas fuentes de agua tienen también prácticamente todos los minerales traza eliminados por diseño. Ya que estos compuestos son extremadamente importantes para la salud y el mantenimiento de los animales y de la capacidad de amortiguación del sistema de agua. El agua necesita estar adecuadamente acondicionada por la adición de minerales compuestos. La adición de un acondicionamiento mineral comercialmente disponible en preparaciones (es decir, sales, y otros compuestos) para el agua antes de su uso ayuda a prevenir enfermedades inducidas por la nutrición o un rápido cambio problemático en el pH dentro del sistema de agua. Es importante recordar que con la pérdida por evaporación del agua del sistema, la salinidad del sistema seguirá aumentando por lo

tanto, la concentración de la misma en el agua debe ser monitoreada adecuadamente para evitar la exposición de los peces a un nivel de salinidad más allá del rango de tolerancia normal (Kent *et al.*, 2011; Kent *et al.*, 2014; Hammer, 2020).

1.2.7. Alimentación de los peces

Al igual que con todas las demás especies de animales de laboratorio, es importante proporcionar a los peces cebras una dieta completa y equilibrada. Adultos y juveniles (> 10-14 días de edad) se pueden mantener en una dieta artificialmente formulada en forma de escamas secas o pellets que están fácilmente disponibles en una variedad comercial. Además de aportar los 40 nutrientes esenciales (vitaminas, minerales, etc.), estas dietas proporcionan fibra para ayudar en la digestión e incorporación de pigmento como fuente para la coloración natural. Las vitaminas, lípidos y pigmentos del contenido del alimento comercial puede degradarse si se almacena incorrectamente o durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, la vitamina C (Ácido L-ascórbico) se degrada en presencia de oxígeno, humedad, luz, y temperaturas elevadas. Y deficiencias de vitamina C en los peces se han asociado con un crecimiento reducido, una menor viabilidad del huevo, escoliosis, lordosis, erosión de la aleta / cola y mortalidad. Una vez abierto un envase debe ser refrigerado y utilizado dentro de 1 mes. Aunque los fabricantes de alimentos de alta calidad deben proporcionar una codificación de lote y fecha de vencimiento para evitar el uso de alimentos que caducaron. El pez cebra recién eclosionado presenta un problema al alimentarlo con una formulación de dieta seca. Dado que estos peces jóvenes tienen por lo general, 0.5-1.0 cm de longitud, obtener una dieta que sea suficientemente pequeña para ser consumida fácilmente puede ser difícil. Por estas razones, los peces jóvenes de hasta 10-14 días de edad son alimentados de forma exclusiva en una dieta de *Paramecium* spp. (Protozoo ciliado) cultivado dentro del laboratorio. A los 10-21 días de edad del pez, el mejor enfoque es ofrecer una mezcla de Paramecios y cantidades crecientes de alimento seco hasta que los peces jóvenes acepten fácilmente una dieta exclusiva de alimento seco. El adecuado manejo nutricional de los peces a los 10-21 días de edad es crítico, y una alta mortalidad se encuentra con frecuencia durante esta etapa de desarrollo. Entonces se puede minimizar si se ofrece a los peces una dieta mixta de alimentos vivos y artificiales así algunos laboratorios pueden mantener un rendimiento reproductivo. También se puede mejorar la dieta mediante la suplementación de alimento seco y alimento vivo como ser los Nauplios de camarón de salmuera (*Artemia salina*, larvas de *Drosophila* o rotíferos como *Brachionus*) pues son las fuentes de alimentos vivos más comunes y fácilmente obtenibles. La

frecuencia de la alimentación es un tema importante de preocupación para el laboratorio pues los peces no deben ser alimentados con más alimentos de los que puedan consumir en 3-5 min. La comida que no se come rápidamente se hunde y es absorbido por el sistema de recirculación de agua, donde se descompone rápidamente y es una fuente importante de residuos de nitrógeno en el sistema de agua. Esta comida en descomposición puede influir negativamente en la calidad del agua al aportar grandes cantidades de amoníaco que puede interrumpir el biofiltro y producir cambios repentinos de pH. La alimentación es una causa importante de la mala calidad del agua en términos de exceso de productos nitrogenados, alto recuento de bacterias y fluctuación del pH. Mientras que los jóvenes y las crías de peces cebra pueden requerir alimentaciones múltiples diarias, en un pez cebrado adulto solo se requiere alimentarlo una o dos veces al día pues maximiza la salud de los peces y la calidad del agua del sistema. Cuando se alimenta a los peces hasta 3 o más veces al día se ha descrito como forma rutinaria para mantener la fertilidad óptima de reproducción de peces activos, pero es importante tener en cuenta los efectos adversos de esta práctica pues puede contribuir con altos niveles de nitrógeno en los residuos de alimentos (Watts *et al.*, 2016).

1.2.8. Adquisición de peces

La introducción de nuevos animales constituye siempre un riesgo de ingreso de patógenos en una colonia libre de patógenos específicos (SPF). Sin embargo, los peces de tipo salvaje o transgénicos pueden ser introducidos de forma segura en una instalación mediante el uso de una cuarentena rigurosa o mediante la implementación de un programa de vigilancia y obtención de animales de calidad. Muchos laboratorios implementan actualmente en forma rutinaria la cuarentena para animales adultos ingresantes. Estos peces son criados en cuarentena y los huevos fertilizados son colectados y tratados con una solución de hipoclorito. Una vez eclosionados los alevinos son introducidos en la sala principal de peces. Si bien este enfoque, sin duda, ofrece protección contra la introducción de muchos patógenos potenciales, protocolo de tratamiento no debe interpretarse como un procedimiento para eliminar todo riesgo de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la transmisión vertical de *Mycobacterium* spp. se ha demostrado en peces vivos (vivíparos) como guppies y platys; sin embargo, la transmisión vertical en especies ovíparas como el pez cebrado no se ha determinado (Stoskopf, 1993; Noga, 1996). Es importante tener en cuenta que la mayoría de los minoristas actualmente realizan el suministro de stocks de pez cebrado de tipo salvaje a la investigación de laboratorio en donde la comunidad son principalmente proveedores de

peces tropicales ornamentales. Pero es desconocido el estado sanitario de los animales que llegan a las instalaciones. Es muy importante evaluar todos los peces entrantes debido a las posibles infecciones latentes o subclínicas antes de su introducción en un sistema establecido en la colonia de peces. Mucho tiempo se utilizó la adquisición de pez cebra de las tiendas de mascotas para el out-crossing pero actualmente no se usa por tener un alto grado de rotación tanto en animales entrantes como salientes en los comercios y esto usualmente da como resultado un escaso o nulo análisis de las enfermedades, con acuarios con sobrepoblación y peces estresados por las condiciones de envío; y donde los patógenos pueden propagarse rápidamente entre los peces residentes estresados o debilitados. Debido al alto volumen de peces dentro de estas tiendas, los peces frecuentemente se infectan con los patógenos acuáticos más comunes como por ejemplo *Mycobacterium* spp., *Capillaria* spp., e *Ichthyophthiirius* spp. Entonces los peces obtenidos de un acuario local deben ser considerados como candidatos de alto riesgo para albergar patógenos y deben estar en cuarentena por un mínimo de 30-45 días antes de la introducción en el centro de investigación y en ese lapso realizar controles sanitarios con pruebas de tamiz por PCR u otras pruebas diagnósticas. En relación a la transferencia de peces entre instalaciones de investigación debido a la rápida expansión en el número y tamaño de instalaciones de pez cebra en todo el mundo, encontramos que el número de animales transgénicos y sus fenotipos resultantes están aumentando dramáticamente y así como también varios grupos de investigación están constantemente intercambiando estos peces transgénicos entre sus respectivas instalaciones. Por tanto, es importante conocer el estado de salud actual de la instalación de la cual se obtienen los peces. El estableciendo de un amplio sistema de vigilancia de la salud entre diversas instituciones podría permitir el traslado más seguro y conveniente de los animales entre instalaciones. Asimismo, es esencial compartir información de salud precisa de la colonia antes del envío. La información falsa, obsoleta o inexacta sobre el estado de salud, especialmente con respecto a los patógenos infecciosos, puede dar lugar a una pérdida significativa de animales valiosos, tiempo de investigación y fondos en una instalación desprevenida que recibe animales enfermos (Kent *et al.*, 2011; Kent *et al.*, 2014).

1.3. MANEJO DE LA SALUD EN LAS COLONIAS DE PEZ CEBRA

Un programa de control de salud debe minimizar o eliminar el impacto de las enfermedades infecciosas en la salud animal y los resultados de la investigación, así como proteger la salud humana. Hay muchos factores a considerar cuando se diseña un

programa de control de salud: tamaño y diversidad del programa de investigación, frecuencia de importación, tipo de alojamiento (diseño de las instalaciones) y manejo, uso de alimentos vivos frente a comerciales, agentes a controlar, metodologías de prueba para ser utilizado, frecuencia y costos financieros. Los programas de control de la salud bien diseñados realizarán un seguimiento de la salud de una colonia de pez cebra a lo largo del tiempo, así como también ayudarán en la identificación de los problemas de bioseguridad y cría a medida que sean visibles. La exclusión de patógenos de las colonias de pez cebra es la herramienta más poderosa para proteger la salud del pez cebra. Sin embargo, cuando se producen interrupciones en la bioseguridad, la detección de patógenos lo antes posible permite una evaluación rápida de los riesgos para la salud animal y los programas de investigación, así como una rápida acción para la biocontención (Astrofsky *et al.*, 2002; Kent, *et al.* 2011; Kent *et al.* 2014).

Los programas de control de la salud de las colonias deben reflejar las necesidades de la investigación que se realiza en la institución y mostrar flexibilidad para adaptarse a las necesidades cambiantes. Por ejemplo, las investigaciones que utilicen modelos de animales inmunocomprometidos o que realicen estudios de toxicología deben excluir tantos agentes patógenos como sea posible, mientras que los patógenos oportunistas pueden considerarse aceptables para otros objetivos de investigación. Cada instalación o programa debe determinar la frecuencia de las pruebas y la lista particular de agentes de interés y debe revisar su programa de control de salud a medida que haya nueva información disponible. En general, los agentes, que pueden tener un impacto significativo en el programa de investigación, deben someterse a pruebas con más frecuencia. Los agentes que presentan menos riesgo para el programa debido a la baja prevalencia o baja patogenicidad se pueden controlar con menor frecuencia.

La pérdida inesperada de peces valiosos utilizados como modelo animal en investigación debido a enfermedades, es una de las causas más frecuentes de fracasos en la investigación. Si estas pérdidas ocurren debido a una mortalidad lenta e insidiosa o por una repentina epizootia o una falla en el sistema de soporte vital, influyen en forma negativa en la validez de los resultados, con datos estadísticos confusos y pérdida de horas de trabajo en investigación.

En la actualidad existen programas de control sanitario adaptados al pez cebra que permiten una estandarización sanitaria similar a la que se desarrolla en instalaciones de roedores de experimentación (Kent *et al.*, 2009; Kent, *et al.* 2011; Kent *et al.* 2014).

1.3.1. Interacción huésped-patógeno-ambiente

La infección es siempre el resultado de una interacción compleja del huésped, medio ambiente y patógeno (Figura 3). Los tres factores pueden estar fuera de balance en un ambiente artificial de las instalaciones de peces de laboratorio.

Uno de los objetivos principales del manejo de peces de experimentación es mantener el sistema acuático en un estado equilibrado donde el huésped y los patógenos potenciales coexisten en un entorno de laboratorio controlado.

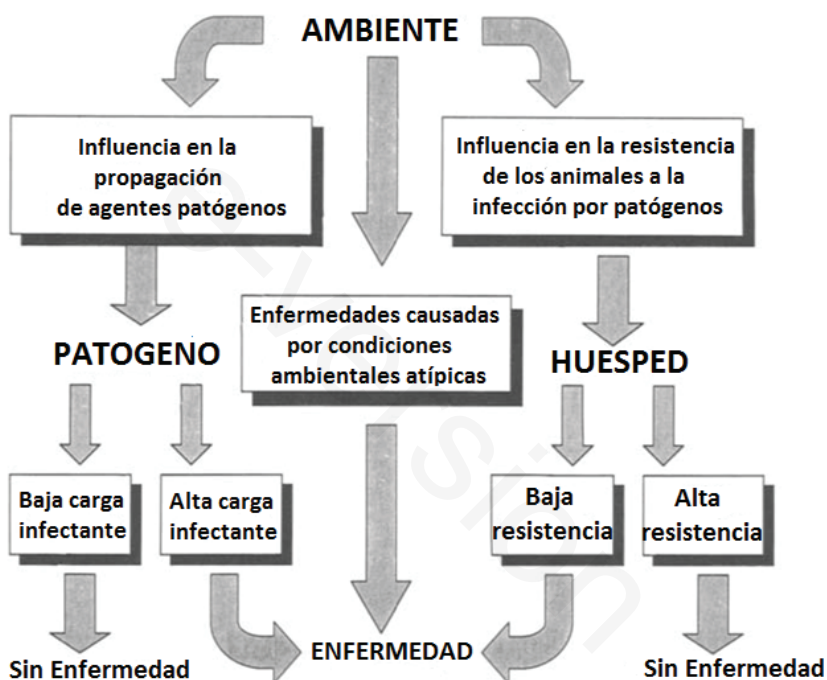


Figura 3. Diagrama de interacción huésped-patógeno-ambiente. El ecosistema acuático mantiene un delicado equilibrio entre los peces, los patógenos potenciales y el medio ambiente parámetros Si bien relativamente pocas enfermedades son el resultado directo de desequilibrios ambientales (por ejemplo, cambios bruscos de temperatura, enfermedad de las burbujas), el medio ambiente tiene una influencia directa sobre las poblaciones potenciales de patógenos y la resistencia del huésped a la enfermedad.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00020-1>

Debido a que los sistemas acuáticos son ecosistemas muy complejos, las relaciones patógeno-huésped son difíciles de acceder en el ambiente artificial de laboratorio. En consecuencia, controlar los brotes de las enfermedades puede ser una tarea difícil. En principio, los patógenos primarios pueden inducir enfermedades cuando otros factores ambientales están en equilibrio y deben distinguirse de los patógenos secundarios u oportunistas que causan enfermedades cuando otros metabólicos o factores ambientales no son óptimos. La salud deficiente en los animales es a menudo una conjunción de una o más variables ambientales marginales tales como la temperatura, pH, dureza / alcalinidad u otro elemento químico inadecuado, nutrición, exceso de bioincrustaciones o sobrecrecimiento bacteriano.

La enfermedad en el medio acuático por lo general, se produce cuando los factores en un ambiente marginal encuentran el equilibrio a favor del patógeno.

El diagnóstico de la enfermedad puede observarse como el reconocimiento del desequilibrio dentro del sistema. La prevención actúa como un amortiguador para extender los límites del sistema equilibrado. El objetivo de un tratamiento sanitario es restaurar equilibrio a un sistema interrumpido. La gestión adecuada de la salud y el control de las enfermedades dependen de la implementación efectiva de las prácticas de laboratorio como medicina preventiva, diagnóstico y tratamiento (Kent *et al.*, 2009).

Al evaluar la salud de una colonia, es importante evaluar además el comportamiento de los animales a diario y realizar evaluaciones diagnósticas de mortalidades inexplicables así como los diagnósticos rutinarios en los animales centinela (Astrofsky, 2002).

Varios signos inespecíficos en apariencia anormal o de comportamiento pueden ser útiles en el diagnóstico inicial para ayudar a determinar el agente o evento causal.

Es importante recordar que estos son signos clínicos inespecíficos de alguna posible enfermedad y son útiles solo para formar una lista inicial de diagnósticos diferenciales.

Por lo tanto se deben implementar pruebas de diagnóstico más específicas para identificar con precisión el agente causal respecto a la identificación de signos clínicos, diagnósticos y tratamientos disponibles para la instalación.

La siguiente lista (Tabla 1) muestra algunos signos clínicos generalizados y el diagnóstico presuntivo (Astrofsky, 2000; Matthews, 2004).

Tabla 1: Signos generales y diagnóstico presuntivo en peces cebra (Astrofsky, 2000).

Signos clínicos	Diagnóstico
Congestión opercular	dificultad respiratoria, parásitos, infección bacteriana
Mucosidad desprendida	irritación química, parásitos protozoos
Aletas adheridas al cuerpo	parásitos
Petequias o hemorragias	infección bacteriana, parásitos
Cambios en el color del cuerpo	infección bacteriana, influencia hormonal
Pérdida de peso	parásitos, trauma mecánico
Trastornos en vejiga natatoria	bacterias, parásitos
Letargo	enfermedad, estrés, inanición
Respiración superficial	agotamiento de oxígeno
Toxicidad química	cambio brusco en la calidad del agua

1.3.2. Enfermedades del pez cebra en instalaciones de investigación

Aunque el pez cebra se ha convertido en un modelo de investigación importante, se sabe relativamente poco acerca de las enfermedades que afectan a esta especie cuando se mantienen en cautiverio. Muchas de los agentes que causan estas enfermedades pueden detectarse en los animales o en muestras del medio ambiente que habitan (Figuras 4 y 5). De hecho, los problemas de salud en las colonias de investigación del pez cebra podrían poner en grave peligro muchos recursos económicos en investigación, y las

instalaciones de algunos investigadores han experimentado mortalidades devastadoras y graves en sus colonias de pez cebra. Además, las infecciones persistentes, pero menos graves, han contaminado varias instalaciones. Al igual que con otros animales de laboratorio utilizados en la investigación, es imperativo realizar estudios con un pez cebra libre de enfermedades (Kent *et al.*, 2009). A diferencia de los modelos de roedores, donde hay muchas cepas certificadas libres de patógenos específicos (SPF), se ha comenzado a producir poblaciones de pez cebra de SPF acorde con una lista de agentes patógenos de los cuales deben estar ausentes en dichos animales (Tabla 2) y que deben ir acompañadas de pruebas de diagnóstico sensibles para los patógenos graves (Collymore *et al.*, 2016).

Tabla 2: Agentes patógenos de pez cebra, clasificación y patogenicidad (Collymore *et al.*, 2016).

Agente	Clasificación	Patogenicidad
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bacteria	Usualmente oportunista
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Bacteria	Patógeno primario
<i>Flavobacterium columnare</i>	Bacteria	Patógeno primario
<i>Mycobacterium</i> spp.	Bacteria	Patógeno primario o secundario
<i>M. abscessus</i>		
<i>M. chelonae</i>		
<i>M. fortuitum</i>		
<i>M. haemophilum</i>		
<i>M. marinum</i>		
<i>M. peregrinum</i>		
<i>M. saopaulense</i>		
<i>Coleps</i> spp.	Ciliado	Parásito facultativo de larvas
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Ciliado	Patógeno primario
<i>Tetrahymena</i> spp.	Ciliado	Parásito facultativo de larvas

Agente	Clasificación	Patogenicidad
<i>Trichodina</i> spp.	Ciliado	Patógeno primario
<i>Piscinoodinium pillulare</i>	Dinoflagelado	Patógeno primario
<i>Saprolegnia brachydani</i>	Oomiceto	Oportunista
<i>Saprolegnia ferax</i>	Oomiceto	Oportunista
<i>Myxidium streisingeri</i>	Myxozoario	Patógeno primario
<i>Gyrodactylus</i> spp.	Monogeneo	Patógeno primario
<i>Pleistophora hyphessobryconis</i>	Microsporidio	Patógeno primario
<i>Pseudoloma neurophilia</i>	Microsporidio	Patógeno primario
<i>Pseudocapillaria tomentosa</i>	Nematode	Patógeno primario
<i>Transversotrema patialense</i>	Trematode	Patógeno primario
Virus de la necrosis nerviosa de puntos rojos (RGNNV)	Betanodavirus	Patógeno primario
Virus de la septicemia hemorrágica (VHSV)	Rhabdovirus	Infección experimental
Virus de la necrosis infecciosa del bazo y riñón (ISKNV)	Megalocytivirus	Infección experimental
Virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV)	Rhabdovirus	Infección experimental

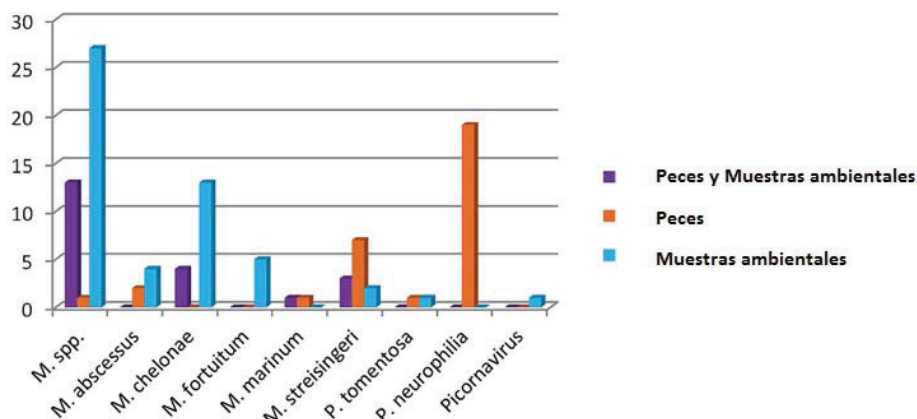


Figura 4. Número de peces y muestras ambientales (1 litro de agua y 25 ml de detritos filtrados en membrana de 0,2 μ m estéril) que dieron positivo para varios patógenos de pez cebra utilizando ensayos de PCR (2019).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222360>

1.3.3. Diagnóstico general, eutanasia y protocolos de necropsia

El pequeño tamaño del pez cebra presenta algunos desafíos únicos y, al mismo tiempo, ventajas para realizar necropsias y otras pruebas de diagnóstico. El conocimiento de las enfermedades del pez cebra es relativamente limitado en comparación con el de los peces que se crían en la acuicultura. Hasta hace poco, la mayoría de las enfermedades del pez cebra que se han documentado, son aquellas que son comunes en la mayoría de los peces ornamentales de agua dulce (p. Ej., *Piscinoodinium*). Pero fue necesario que el pez cebra se reconociera como importante comercialmente y se produzcan en cautiverio en grandes cantidades, para que se reconocieran enfermedades específicas.

Las enfermedades virales son a menudo devastadoras en la producción de otras especies de peces en acuicultura. Sin embargo, como muchos virus son muy específicos del hospedador y generalmente se identifican solo cuando una especie de pez se cría en grandes cantidades en cautiverio. La identificación de "nuevas" enfermedades virales en peces a menudo requiere el establecimiento de nuevas líneas celulares del hospedador bajo investigación. En la actualidad, los virus no se reconocen como causas de enfermedad en el pez cebra y, por lo tanto, no se examina de forma rutinaria la detección de virus en los mismos. Sin embargo, existen líneas celulares provenientes de pez cebra que se están utilizando en experimentación para infecciones virales.

Del mismo modo, con las infecciones bacterianas, aparte de la micobacteriosis, solo ocasionalmente se encuentran bacterias Gram negativas oportunistas, como *Aeromonas hydrophila* e infecciones de superficie por bacterias de deslizamiento como Mixobacterias y Flavobacterias (Ramsay *et al.*, 2009).

La mera presencia de un patógeno en un pez no significa necesariamente que sea la causa de la enfermedad. Por lo tanto, es importante realizar una investigación exhaustiva, más allá de simplemente detectar la presencia o ausencia de patógenos conocidos, para determinar la causa de la enfermedad. Los exámenes histológicos, además de las necropsias macroscópicas y el cultivo *in vitro* de microorganismos, a menudo se requieren para determinar la asociación de los patógenos observados en la enfermedad que se está investigando (Astrofsky *et al.*, 2002).

A pesar del uso cada vez mayor del pez cebra (*Danio rerio*) en la investigación, el método de eutanasia más humano para estos peces no ha sido determinado. El metanosulfonato de tricaina (MS222) se utiliza actualmente, aunque el enfriamiento rápido demostró que el tiempo medio para la eutanasia es más corto y el número de peces que muestran signos de angustia es menor que para los peces expuestos a MS222. Aunque en ambos métodos no se observan cambios histopatológicos ni evidencia de formación de cristales de hielo durante el enfriamiento rápido, se considera que este último método permite una práctica veterinaria más humanitaria (Wilson *et al.*, 2009).

1.3.4. Anamnesis

Para ayudar a obtener un diagnóstico preciso, se debe obtener la siguiente información: origen (stock y cepa), problemas de enfermedades previas en la población afectada y condiciones de manejo como ser, dureza del agua, dieta, historial de medicamentos utilizados, diseño del sistema y tasa de mortalidad (Astrofsky *et al.*, 2002).

1.3.5. Comportamiento

El comportamiento de los peces puede ser útil para indicar una enfermedad emergente y algunos cambios de conducta son útiles para diagnósticos presuntivos. Por ejemplo, si los peces destellan (frotando en los lados de los tanques), esto puede indicar que están infectados con parásitos externos. Otras indicaciones de enfermedad incluyen el cese de la alimentación, el letargo y la posición anormal en el acuario (por ejemplo, en la superficie o en la parte inferior). El patrón respiratorio anormal puede indicar daño en las branquias, y la natación en círculos o en espiral a menudo indica daño neurológico (Collymore *et al.*, 2016).

1.3.6. Muestras para las pruebas

Las muestras que pueden utilizarse para detectar infecciones incluyen los animales y las muestras ambientales (Figura 5). Se pueden tomar muestras de diferentes edades de los animales para el control de la salud: embriones, larvas, juveniles y peces cebra adultos (> 12 meses), peces muertos encontrados en los sumideros del sistema o peces cebra centinela colocados intencionalmente. Cada uno de estos tipos de muestras proporciona información sobre la salud de las colonias (Murray *et al.*, 2011).

En las pruebas directas en animales de las colonias se identificarán patógenos con una alta prevalencia, pero pueden pasar por alto patógenos poco comunes si el tamaño de la muestra no es el adecuado. Debe tenerse en cuenta que utilizar animales de colonias con un fondo genético no uniforme, puede ser una desventaja en los peces muestreados, al igual que la frecuencia del muestreo que puede variar según la disponibilidad de animales. Debido a que muchas enfermedades infecciosas del pez cebra son infecciones crónicas subclínicas y que no son eliminadas por el sistema inmunológico, algunos bioterios usan ejemplares de pez cebra como centinelas porque han tenido una ventana de exposición más larga. La infección por *Pseudoloma spp* es más frecuente en el pez cebra a partir de un año de edad (Ramsay *et al.*, 2009). Del mismo modo, a medida que las hembras en desarrollo son más propensas a tener esporas de *Pseudoloma* dentro de sus ovarios y que pueden propagar la infección tanto verticalmente a través del óvulo u horizontalmente en el medio ambiente. (Murray *et al.*, 2011). Los animales de mayor edad también pueden ser más susceptibles a la reactivación de infecciones por micobacterias latentes. Por lo tanto se recomienda sacrificar a los peces mayores de 12 meses para minimizar la propagación de la infección a través de la colonia (Parikka *et al.*, 2012). Los peces moribundos o muertos también pueden proporcionar información sobre las enfermedades infecciosas presentes en una colonia ya que han sido expuestos a toda el agua del sistema en el que se alojaron. Estos presentan un riesgo para la colonia, ya que pueden desarrollar y luego propagar enfermedades. En ocasiones estos peces pueden pasar desapercibidos en ocasiones en las observaciones diarias. Por lo tanto es recomendable un control riguroso en la observación de las colonias y de encontrarse estos animales retirarlos del sistema y de ser posible, ser sometidos a exámenes de salud (Murray *et al.*, 2011).

El pez cebra se suele alojar en sistemas de recirculación de agua con muchos tanques conectados en paralelo. Esta disposición reduce la probabilidad de transmisión de agentes infecciosos de un tanque a otro, pero también aumenta el tamaño de la muestra

necesaria para detectar patógenos al analizar directamente los animales de las colonias. Los programas de centinelas están diseñados para maximizar la transmisión de patógenos a un grupo más pequeño y optimizar la detección de patógenos utilizando menos animales. Muchos sistemas de producción de pez cebra ahora están diseñados con un área de tanque centinela; Los tanques en estas posiciones pueden estar expuestos al agua del efluente de todo el sistema. Otras ventajas del centinela son que facilitan comparaciones significativas de datos a lo largo del tiempo, pueden incluir un fondo genético conocido sin manipulación experimental y que se encuentran en el sistema durante un periodo de tiempo conocido (Murray *et al.*, 2011). Idealmente, los peces centinela deberían ser introducidos a las colonias donde se utilizarán como centinelas preferentemente en la etapa larvaria ya que de esta manera se minimiza el riesgo de introducir patógenos nuevos o desconocidos en el sistema a partir de centinelas adultos. Si el pez cebra adulto se obtiene de otra colonia o instalación, se debe conocer su estado de salud con respecto a todos los agentes infecciosos de interés para garantizar que se obtuvo un resultado que refleje el sistema que se está monitoreando y no se introdujo con anterioridad junto con el pez que se utilizará como centinela. El periodo mínimo al cual los peces centinela deben exponerse al sistema de agua / acuario al que se está probando, debe ser al menos por 3 meses y deben examinarse cada 3–6 meses para detectar patógenos. En los programas de centinela de roedores, los ratones a menudo se usan porque pueden seroconvertir para una serie de patógenos. Todavía no está claro qué línea de pez cebra puede ser la mejor para la detección de rutina de patógenos. Los peces cebras transparentes (por ejemplo, pez cebra Casper) se han sugerido como una cepa centinela que permite la detección de infecciones por micobacterias. A medida que se aprende más sobre el sistema inmunológico del pez cebra y varias líneas, las recomendaciones futuras pueden incluir una línea específica que sea susceptible a una variedad de patógenos (Murray *et al.*, 2011; Whipps *et al.*, 2014). Cuando se realiza un examen de rutina, el número mínimo de animales muestreados para detectar un patógeno con un 95% de confianza depende de la prevalencia esperada de un patógeno en la colonia, pero en la práctica, el número de peces cebra muestreados no suele estar limitado por restricciones financieras, como en el caso de roedores. Para patógenos de baja prevalencia, la cantidad de peces que se requeriría para detectar la infección a menudo es poco práctica. Además, los cálculos estadísticos deben considerar que todos los peces tienen la misma probabilidad de infectar a todos los demás peces, lo que no es el caso de los sistemas de pez cebra. La exposición de los peces al agua de efluentes es un método que puede usarse para

aumentar las posibilidades de detectar un patógeno con la evaluación de menos peces. La prevalencia esperada suele ser difícil de determinar, ya que el método de alojamiento, la filtración de agua y las prácticas de reproducción pueden tener un impacto significativo en la prevalencia de patógenos en una población de peces (Kent *et al.*, 2009).

El número de peces de una muestra para realizar un control sanitario considerando que se realiza para detectar la presencia de infecciones de los peces (en peces portadores asintomáticos) así como la presencia de peces enfermos, el número de especímenes necesarios para el muestreo se basa en aquel postula una incidencia del 5% y una probabilidad del 95% de que se detecten portadores o muestras infectadas. En general, se requerirá una muestra de 60 peces por muestra a realizar. Sin embargo, en algunas situaciones, como la presencia de reproductores valiosos, o en otras circunstancias, puede ser necesario reducir el tamaño de la muestra para casos particulares. La práctica habitual es que el responsable a cargo de determine la cantidad de muestras requeridas (Pettijon, 1977). La incidencia de un patógeno también puede variar según la genética del animal, el estado inmunológico y los procedimientos de cría. Por estas razones, la prevalencia de la infección puede diferir sustancialmente entre las colonias. Por lo tanto, los peces centinela mantenidos en tanques o acuarios de colonias o en un tanque especialmente diseñado que recibe agua del sistema de efluentes pueden ser el método de detección más confiable. De ser posible, si los animales viejos de la colonia pueden enviarse, eso favorece en proporcionar una imagen más completa de la salud de la colonia. El número de pez cebra muestreado reflejará un balance entre el riesgo de no detectar agentes infecciosos, con el costo del programa de control sanitario (Murray *et al.*, 2011).

Según la técnica a utilizar en el control sanitario, depende también el método de conservación y/o envío al laboratorio de diagnóstico de las muestras de tejidos de los animales a utilizar y que permita una mejor probabilidad de hallar los patógenos especificados (Tabla 3).

El muestreo ambiental es muy útil para la detección de agentes como *Mycobacterium* spp. que proliferan en las biopelículas del sistema y, por lo tanto, son comunes en el medio ambiente. La sensibilidad del tipo de muestra ambiental varía según el ciclo de vida y la biología del agente. Confiar solo en las pruebas ambientales puede ser insuficiente para la detección de agentes que son relativamente poco comunes en el medio ambiente o que son expulsados de manera intermitente o en forma deficiente por peces infectados. Dado que existe información limitada sobre el muestreo ambiental

de patógenos del pez cebra, y dado que algunos patógenos pueden ser más comunes en peces infectados que en el ambiente, el muestreo ambiental debe considerarse un complemento de los animales de prueba (Kent *et al.*, 2009).

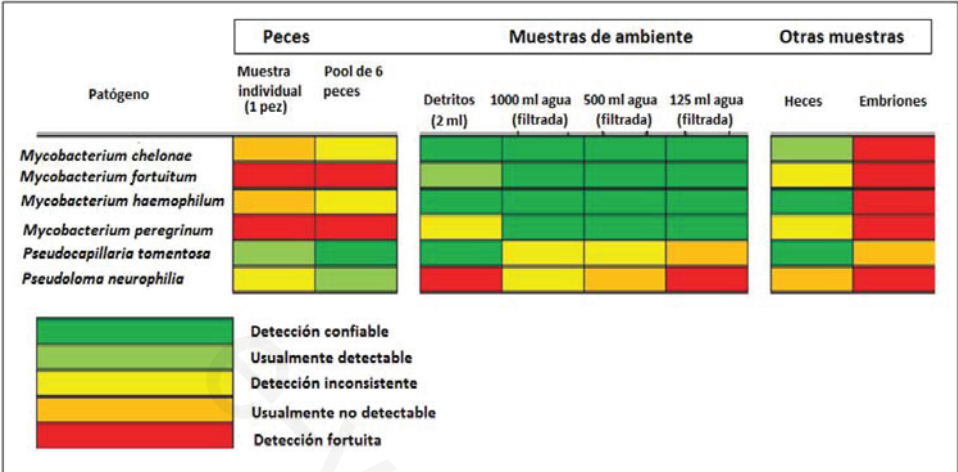


Figura 5. Mapa de colores que resume la sensibilidad de diagnóstico relativa de los diferentes tipos de muestras por PCR para la detección de patógenos: verde oscuro, detectado de manera confiable; verde claro, generalmente detectado; amarillo, detectado inconsistentemente; naranja, generalmente no detectado; rojo, raramente detectado (2017). pmid:28724491

1.3.7. Metodología de las pruebas

La metodología de las pruebas también es un factor importante a considerar al diseñar un programa de control sanitario. La técnica de diagnóstico más adecuada dependerá de varios factores, incluido el tipo de información necesaria, el agente patógeno de interés, la etapa probable de la infección y los costos. Históricamente, el control de salud de las colonias de pez cebra se basó en las necropsias postmortem y la histopatología de pez cebra adulto entero. Hoy en día, existen varias metodologías disponibles para bioterios que incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, PCR convencional, histopatología y exámenes directos simples, como montaje en lámina y observación al microscopio óptico. Para el monitoreo de parásitos externos, se puede realizar un examen con preparaciones de montaje húmedo en porta objeto de aletas y branquias. Las técnicas de diagnóstico molecular, como la PCR convencional, están disponibles comercialmente y proporcionan una sensibilidad y especificidad importante y

con tiempos de respuesta rápidos. La PCR ofrece ventajas significativas para la detección de *Mycobacterium* spp., ya que a menudo, requieren condiciones especiales para el crecimiento bacteriológico y es más demorado el diagnóstico. El cultivo bacteriano puede facilitar el aislamiento y la identificación a nivel de especie de una amplia gama de microorganismos, incluidas bacterias, levaduras, hongos filamentosos y oomicetos. La sensibilidad de la microbiología para el pez cebra varía según la biología de los organismos cultivados y la experiencia del laboratorio con animales acuáticos, ya que varios patógenos de peces tienen requisitos específicos, incluidas temperaturas de incubación únicas, medios de cultivo especializados y / o tiempos de incubación más prolongados (Whipps *et al.*, 2012).

1.3.8. Selección de peces para la necropsia

Los exámenes deben realizarse en peces enfermos que se recolectan en vida (moribundos) cuando sea posible. Es importante determinar la causa primaria de mortalidad y diferenciarla de los patógenos secundarios u oportunistas que pueden haber infectado peces ya enfermos. Para lograr esto, se recomienda examinar varios peces afectados como también muestras de agua con detritos y heces (Figura 4). También es útil incluir peces asintomáticos aparentemente sanos para que se puedan determinar los cambios patológicos tempranos y la causa subyacente de la morbilidad. Los peces muertos pueden ser adecuados para algunos exámenes parasitológicos y para observar cambios patológicos macroscópicos. Sin embargo, los exámenes bacteriológicos realizados en peces muertos pueden dar resultados engañosos, y muchos cambios histológicos son eliminados por la autólisis post mortem (Whipps *et al.*, 2012).

1.3.9. Examen externo

El pequeño tamaño del pez cebra hace que la realización de una necropsia sea algo tediosa, pero con paciencia y práctica esto se puede lograr de manera eficiente y con la ayuda de un microscopio. Es importante observar las anomalías de la superficie (p. Ej., Aletas deshinchadas, ojos nublados, úlceras, decoloraciones de la piel, parásitos y tumores). Se puede preparar sobre una lámina portaobjetos una muestra del mucus de la piel y unas pocas escamas raspando la superficie del pez con un cubreobjetos y colocando este sobre el portaobjetos de vidrio. Se puede agregar algo de agua a la preparación para que el área de la muestra esté completamente llena de líquido. En la observación al microscopio, se recomienda reducir la luz y bajar el condensador ya que

producirá un mayor contraste y permitirá que, de hallarse, los parásitos microscópicos y otros patógenos sean más visibles (Kent *et al.*, 2009; Varga & Murray, 2016).

1.3.10. Branquias

Se retira el opérculo y se observa el color de las branquias (las branquias pálidas generalmente indican anemia). Se verifica si hay presencia de parásitos, quistes, excesiva cantidad de mucus y hemorragias con un microscopio. Puede prepararse una montura húmeda retirando unos pocos filamentos con tijeras, colocando los filamentos en una gota grande de agua dulce en un portaobjetos de vidrio y cubriéndolos con un cubreobjetos. Luego se examina en busca de pequeños parásitos, hongos y bacterias utilizando un microscopio (Kent *et al.*, 2009; Varga & Murray, 2016).

1.3.11. Examen interno

Es necesario abrir la cavidad visceral y observar si hay ascitis, hemorragias u otras anomalías. También examinar el riñón, retirar la vejiga natatoria y detectar cualquier anomalía renal. Muchas enfermedades causan agrandamiento o decoloración del riñón, pero esto puede ser difícil de ver en el pez cebra debido a su pequeño tamaño. Inspeccionar el corazón para revelar cualquier anomalía. Es posible encontrar múltiples quistes blanquecinos en los órganos viscerales que sugieren infecciones por *Mycobacterium spp.* Asimismo se deben examinar las preparaciones de órganos con un microscopio para detectar parásitos, hongos o granulomas enquistados. Las preparaciones se hacen retirando un pequeño trozo de tejido y aplastándolo suavemente entre un portaobjetos y un cubreobjetos, de modo que se forme una muestra fina adecuada para el examen al microscopio (Varga & Murray, 2016).

1.3.12. Improntas

Las muestras de riñones o de otros órganos afectados teñidas con Giemsa son útiles para la detección de protozoos y bacterias. Se retira un trozo de órgano y se seca sobre una toalla de papel limpia para eliminar la mayor parte de la sangre para luego tocar ligeramente la superficie cortada de la muestra en un portaobjetos de vidrio limpio. Se pueden hacer varias impresiones de la misma pieza de tejido en una lámina. Luego se seca la preparación a temperatura ambiente durante 1/2 h. se cubre el portaobjetos durante 5-10 minutos con metanol absoluto en la tinción de Giemsa. El portaobjetos con la muestra teñida también puede enviarse a un laboratorio de diagnóstico.

Para *Mycobacterium* spp, las muestras o improntas y los frotis de tejido se tiñen con tinciones ácidas rápidas como Ziehl Neelsen (Kent *et al.*, 2009, Varga & Murray, 2016).

1.3.13. Bacteriología

Algunas infecciones bacterianas, como las bacterias de deslizamiento de superficie y *Mycobacterium* spp., se pueden identificar por tinciones rápidas ácidas (por ejemplo, Ziehl Neelsen). Sin embargo, el diagnóstico de otras enfermedades bacterianas requiere el aislamiento de las colonias de bacterias en el cultivo. En este caso, los peces vivos deben enviarse al laboratorio, pero esto puede no ser práctico en algunas situaciones, por lo que es necesario realizar métodos para obtener cultivos bacterianos iniciales y luego los mismos se pueden enviar a un laboratorio para una identificación completa. En este caso deben utilizarse peces recién sacrificados para exámenes bacteriológicos, ya que los peces muertos de los acuarios o tanques son esencialmente inútiles. Se debe desinfectar la superficie del pez con etanol al 70%. Esterilizar los instrumentos de disección. Se utilizan dos métodos para obtener muestras del riñón. Uno es el método visceral, en donde se debe abrir la cavidad visceral haciendo una incisión en la pared abdominal sin cortar en el tracto gastrointestinal. Luego se hace a un lado la vejiga natatoria con unas pinzas esterilizadas y se inserta un hisopo o ansa estéril en el riñón. El otro es el método dorsal, en donde se ingresa al riñón por una incisión lateral dorsal al mismo (es decir, cerca de la línea lateral). Luego se siembra la muestra en placas bacteriológicas de agar tripticasa soja o agar sangre, se sellan las placas y se mantienen a temperatura ambiente y luego se envían las placas al laboratorio de microbiología para un diagnóstico adicional.

Para las bacterias deslizantes (*Cytophaga*, *Flexibacter* y *Flavobacterium* spp.), se recomienda Cytophaga Medium. Y aunque las lesiones pueden mostrar un gran número de bacterias deslizantes, otras bacterias (por ejemplo, *Aeromonas* spp.) pueden crecer en exceso sobre las primeras. Por lo tanto, la mejor manera de obtener cultivos puros de bacterias deslizantes es homogeneizar el tejido infectado (p. Ej., Branquias, piel y músculo) en agua estéril e inocular en diluciones en serie en placas con agar.

Las preparaciones teñidas con Gram pueden revelar un gran contenido de bacterias en el tejido infectado al realizar una impronta de los tejidos sospechosos en un portaobjetos y que luego se seca a temperatura ambiente y se fija la lámina calentándola suavemente sobre una llama durante 3-5 segundos (Kent *et al.*, 2009).

1.3.14. Virología

Al igual que con las enfermedades bacterianas, el aislamiento de virus en el cultivo puede ser utilizado para diagnosticar una enfermedad viral, y es posible utilizar células de tejidos recolectados de peces recién sacrificados para realizar el cultivo viral y realizar un diagnóstico por pruebas serológicas. Si esto no es práctico los peces para el examen de virus pueden ser congelados y controlados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la actualidad, no existen muchas enfermedades virales conocidas de las colonias de pez cebra aunque se informó de un caso de infecciones virales naturales para esta especie. En 2015, se detectó el *virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón* (ISKNV) en el pez cebra de un centro de investigación en España. Los peces afectados mostraron letargo, pérdida de apetito, natación anormal, distensión de la cavidad celómica y, en los casos más graves, dificultad respiratoria, branquias pálidas y hemorragias petequiales en la base de las aletas. La citomegalia fue el hallazgo histopatológico más relevante en órganos y tejidos, a veces asociado a cambios degenerativos y necróticos. ISKNV pertenece al género relativamente recientemente *Megalocitivirus* de la familia *Iridoviridae*, que comprende grandes virus de ADN citoplasmáticos icosaédricos. Este es el primer caso de infección por *megalocitivirus* natural en las instalaciones de investigación de pez cebra, asociada con la morbilidad. El virus se ha identificado en base a evidencia tanto patológica como genética, para comprender mejor la patogénesis de la infección en el pez cebra y la relación filogenética con otros iridovirus. Dada la capacidad de los megalocitivirus para cruzar los límites de las especies, parece necesario implementar prácticas estrictas de bioseguridad, ya que estas infecciones pueden invalidar los datos experimentales y tener un gran impacto en los peces de laboratorio y cultivados, como también la incorporación de cultivos celulares de tejidos de peces en investigaciones, es probable que enfermedades virales "nuevas" sean reconocidas en el pez cebra (Bermúdez *et al.*, 2018; Varga & Murray, 2016).

1.3.15. Biología Molecular

Las pruebas de diagnóstico basadas en el ADN que utilizan PCR son cada vez más comunes en los diagnósticos de salud de los peces porque son muy sensibles y específicas. En el pez cebra, se han desarrollado pruebas de PCR para varios agentes patógenos o para identificar y diferenciar diferentes especies de *Mycobacterium*. Debido a la extrema sensibilidad de la técnica de PCR, se debe tener mucho cuidado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras, como también intercambiar instrumentos

entre las mismas. Las muestras pueden congelarse inmediatamente o conservarse en etanol. Se obtienen resultados mixtos cuando se usan tejidos conservados con formalina para el análisis genotípico. Es importante tener en cuenta que los procedimientos de descalcificación, que se usan de forma rutinaria cuando se procesa pez cebra para histología, son particularmente perjudiciales para los análisis moleculares (Astrofsky *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001).

Tabla 3: Métodos de conservación de tejidos de peces y sus usos en exámenes diagnósticos de enfermedades de los peces

+++ = óptimo; ++ = satisfactorio en la mayoría de los casos; + = subóptimo, se puede usar si no hay otro tejido disponible; 0 = inútil

	Vivo	Con hielo	Congelado	Preservado *
Parasitología	+++	++	+	+
Bacteriología	+++	+	+	0
Virología	+++	++	+	0
Toxicología	+++	++	+++	0 a +++
Histología	+++	+	+	+++
Microscopio de electrones	+++	+	0	+++
PCR	+++	++	+++	

*Preservado en fijador a base de formalina (ej. Fijador de Dietrich) para histología, fijador a base de glutaraldehído para microscopía electrónica, etanol al 95% para pruebas de PCR.

1.4. ENFERMEDADES BACTERIANAS

1.4.1. Micobacteriosis

Las infecciones bacterianas crónicas y sistémicas producidas por varias especies de *Mycobacterium* se diagnostican con frecuencia en peces de acuario. Las especies que se encuentran más comúnmente son *M. marinum* , *M. abscessus* , *M. chelonae* y *M. fortuitum*. Estas especies, así como *M. peregrinum* y *M. haemophilum*, se han asociado con micobacteriosis en el pez cebra (Astrofsky *et al.*, 2000; Kent *et al.*, 2004).

Las micobacterias miden de 1 a 10 µm de largo, son pleomórficas, débilmente grampositivas, ácido-resistentes, aeróbicas e inmóviles en forma de bastón.

Las micobacterias atípicas facultativas son patógenos y se han descrito en más de 151 especies de peces, incluidos los de agua dulce y marinos.

Según la manifestación de la enfermedad, las micobacterias se pueden caracterizar ampliamente como patógenos u oportunistas en el pez cebra, siendo *M. haemophilum* y *M. marinum* agentes patógenos y *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. peregrinum* son oportunistas.

Las micobacterias son comúnmente identificadas en instalaciones de investigación de pez cebra. Los agentes más diagnosticados incluyen *M. chelonae*, *M. haemophilum*, *M. abscessus*, *M. marinum* y *M. fortuitum*. La mayoría de las micobacteriosis del pez cebra son crónicas con morbilidad y mortalidad bajas. Las micobacterias atípicas pueden sobrevivir fuera del huésped en biopelículas superficiales, lo que contribuye a su éxito para sobrevivir y convertirse en un residente de la flora microbiana. (Noga, 2010).

Por lo general, la micobacteriosis es crónica con un bajo nivel de mortalidad, pero en ciertas circunstancias, las infecciones pueden ser muy agudas y provocar epizootias graves en colonias de pez cebra. Aún no se han determinado los factores más característicos de las diferencias observadas en la gravedad de los brotes de micobacteriosis en peces. Se desconoce si las cepas o especies altamente virulentas causan los brotes agudos, o si los brotes ocurren en peces que están inmunocomprometidos por otros factores, como la mala calidad del agua, el hacinamiento y el manejo excesivo. *Mycobacterium* spp. de los peces pueden infectar a los humanos. En la mayoría de los casos, las infecciones se limitan a las extremidades y, aunque no suele ser potencialmente mortal, pueden requerir tratamientos agresivos con antibióticos para resolverlos (Kern *et al.*, 1989; Shih *et al.*, 1997; Hoyen & col., 1998; Laborde & Milocco, 2008). Sin embargo, estas infecciones pueden ser letales para individuos inmunocomprometidos (Lessing *et al.*, 1993). Teniendo en cuenta el potencial zoonótico de *Mycobacterium* spp., aquellas personas que manipulan peces de acuario, incluido el pez cebra, deben higienizarse mediante el lavado de manos después de entrar en contacto con agua que contiene peces, y evitar exponer las lesiones abiertas en la piel al agua y los peces del acuario. La mayoría de los casos de micobacteriosis humana asociada con peces son causados por *M. marinum*. Se considera que esta especie no crece, o crece muy mal, a 37 °C. La mayoría de los casos de *M. marinum* no ponen en peligro la vida y se limitan a extremidades, donde las temperaturas corporales son más bajas. Sin embargo, algunas cepas de *M. marinum* son capaces de crecer en cultivo a 37

°C, y otras que no capaces de crecer a esta temperatura en medios pueden hacerlo a 37 C en líneas celulares de macrófagos y en ratones (Kent *et al.*, 2006).

En relación a los signos clínicos y patología se conoce que los cambios clínicos y macroscópicos asociados con *Mycobacterium spp.* son variables, dependiendo del sitio y la extensión de la infección, y de la "cronicidad" de la infección. Los signos clínicos incluyen letargo, anorexia y emaciación. Los peces pueden presentar úlceras, hemorragia o hiperemia alrededor de la cabeza (similar a la septicemia gram negativa), escamas elevadas, aletas deshinchadas y palidez de la piel o branquias. Un cambio macroscópico distintivo es la presencia de múltiples nódulos blancos en diversos órganos viscerales. Estos son visibles mediante un examen detallado de los órganos con un microscopio óptico, pero pueden ser difíciles de encontrar en peces pequeños, como el pez cebra y donde se describieron varias formas de la enfermedad. Los peces infectados pueden mostrar en general una capacidad reproductiva disminuida, así como cambios característicos como ser la hidropesía (edema generalizado con abdomen hinchado) y úlceras visibles en la piel (Astrofsky *et al.*, 2000).

Mediante la observación al microscopio óptico en una micobacteriosis de peces "típica" (es decir, la forma crónica), el examen histológico revela numerosos granulomas, a menudo con centros necróticos, en todos los órganos viscerales. Estos se pueden ver en preparaciones frescas en portaobjetos, pero se pueden confundir con parásitos enquistados. Una tinción de estos tejidos con tinciones ácido-rápidas a menudo revelará bacilos de coloración roja en las lesiones. En infecciones más agresivas, asociadas con una mortalidad rápida, es posible observar acumulaciones masivas de macrófagos repletas de bacterias en todas las vísceras (peritonitis crónica severa) y ocasionalmente se extienden hacia el músculo. Cuando los casos son muy agudos los granulomas pueden estar ausentes o presentarse en poca cantidad. También es posible encontrar micobacterias en la pared de la vejiga natatoria y en el epitelio intestinal, lo que indica que estos pueden ser sitios de posibles entradas para el inicio de infecciones (Kent *et al.*, 2006).

El diagnóstico presuntivo se logra mediante la observación de múltiples granulomas en órganos viscerales, ya sea de muestras frescas en portaobjetos o en cortes histológicos. Es posible que estos también puedan ser causados por infecciones de hongos o parásitos por lo que es necesario un diagnóstico diferencial. El diagnóstico final requiere la visualización de bacilos ácido-rápidos en cortes histológicos de tejidos. A menudo, el pez cebra se descalcifica durante el procesamiento histológico, y recientemente encontramos que ciertos procedimientos de descalcificación agresivos

pueden inhibir la tinción ácida de *Mycobacterium* spp. en cortes de tejido (Kent *et al.*, 2006a).

Algunas especies de *Mycobacterium* son relativamente difíciles de cultivar en medios de cultivo, por lo que este procedimiento no se emplea frecuentemente en peces.

Se han descrito pruebas de PCR para detectar la presencia del agente causal (Colorni *et al.*, 1994; Astrofsky *et al.*, 2000). Estas pruebas, aunque son extremadamente sensibles, por lo general no proporcionan información sobre el estado de la enfermedad o la gravedad de la infección, pero pueden ser útiles para la detección de infecciones portadoras o subclínicas. También es posible utilizar pruebas de PCR para obtener la secuencia de micobacterias directamente de peces infectados y que es muy útil, para la identificación de especies de bacterias que son difíciles de cultivar en medios de cultivo (Kent *et al.*, 2004; Poort *et al.*, 2006).

En tratamiento y control de la infección es muy difícil de erradicar de los bioterios de producción de peces mediante la administración con antibióticos. Sin embargo, Conroy & Conroy. (1999) observaron que la kanamicina a 50 ppm con 4 dosis separadas durante 2 días aparentemente controlaba la enfermedad en *guppies*. Boos *et al.* (1995) trataron los cíclidos de boca de fuego y tetras del Congo por vía oral con rifampicina y tetraciclina con cierto éxito. Sin embargo, la despoblación de los tanques afectados y el evitar la contaminación cruzada ha sido la manera más efectiva de controlar la infección en los peces de acuario. Debido a que la enfermedad es bastante insidiosa, la infección está muy extendida en los peces de acuario, y el tratamiento con antibióticos es difícil de implementar y lograr una erradicación del patógeno, por lo que la mejor profilaxis es evitar la infección. Esto se logra mediante estrictos procedimientos de cuarentena, desinfección de elementos del acuario, la optimización de la calidad del agua y las condiciones de manejo, reducirán la probabilidad de que ocurran epizootias cuando algunos peces portadores están presentes en la población (Astrofsky *et al.*, 2000).

1.4.2. Bacterias deslizantes

Son los procariotas morfológicamente más complejos. El deslizamiento es un movimiento sin la intervención de flagelos, deslizándose las bacterias sobre superficies sólidas sin que tampoco se contraiga el cuerpo de la bacteria.

Este movimiento es muy lento comparado con el movimiento a través de flagelos que puede ser entre 1000 y 5000 micras/minuto mientras que el deslizamiento supone entre 1 y 20 micras/minuto.

Varias especies de bacterias deslizantes (*Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Cytophaga* spp.) causan infecciones en la piel en peces de agua dulce y marinos. Una de estas enfermedades, denominada enfermedad bacteriana de las branquias (BGD, por sus siglas en inglés), es una infección causada por estas bacterias cuando se dan condiciones de hacinamiento y una deficiente calidad del agua. Por lo tanto, BGD también se conoce como "enfermedad ambiental de las agallas". Dos bacterias de deslizamiento, *Flavobacterium columnare* y *F. branchiophilum*, son especies específicamente responsables con la enfermedad en agua dulce. Otras bacterias pueden causar o estar involucradas de manera secundaria con las lesiones. El factor clave de predisposición es la carga orgánica alta de varios componentes y posiblemente la cantidad de amoníaco en el agua. Esta condición se encuentra generalmente en los criaderos de producción de salmónidos. En el pez cebra, se ha detectado BGD después de envíos en los cuales los peces estuvieron en tránsito durante un tiempo prolongado (Kent *et al.*, 2004).

En relación a los signos clínicos, el más característico de la mayoría de las enfermedades de las branquias, es que los peces exhiben dificultad para respirar y suelen acumularse en la capa superficial del agua. Las infecciones de las aletas y la cola (conocidas como podredumbre de las aletas y la cola) se caracterizan por la erosión de las mismas. La piel infectada generalmente aparece blanca debido a la pérdida de la epidermis y la exposición de la dermis (Kent *et al.*, 2004).

La observación al microscopio óptico en los exámenes de montaje en portaobjetos de muestras de branquias infectadas revelan laminillas secundarias fusionadas debido a la hiperplasia epitelial y también puede observarse masas de bacterias filamentosas en la superficie de las branquias. En estos casos, la microscopía de contraste de fase es útil para la visualización de las bacterias. En cortes histológicos revelan hiperplasia epitelial severa de las branquias y ocasionalmente necrosis. Un examen cuidadoso puede revelar colonias de bacterias en la superficie de las branquias (Kent *et al.*, 2004).

Las infecciones producidas por bacterias que se deslizan generalmente se diagnostican mediante la observación de masas de las mismas en el tejido infectado. Con BGD, la superficie de las branquias se asocia con una producción excesiva de moco e hiperplasia del epitelio branquial. Todos estos cambios pueden visualizarse en preparaciones de muestras en fresco de los tejidos infectados. La histología es útil para demostrar los cambios patológicos de las branquias y el grado de invasión de las bacterias en la piel (Kent *et al.*, 2004).

Para el control y tratamiento la mejor manera en una potencial infección con BGD, es evitar el hacinamiento y mantener la calidad adecuada del agua. También cuando se realiza un envío de peces vivos, debe controlarse que los peces no sean alimentados unos días antes del transporte, como también mantener las densidades bajas de animales en las bolsas de transporte y seleccionar una ruta rápida de viaje.

El tratamiento químico más común para BGD en salmónidos ha sido la cloramina T en aproximadamente 6-15 ppm en forma de baño de 1 h de duración y puede requerir repetir el tratamiento. También es posible tratar los animales con peróxido de hidrógeno para tratar infecciones experimentales en truchas en dosis de 100 mg / L de peróxido de hidrógeno (baños de 1 h) como un tratamiento eficaz. Sin embargo, no ha sido probado el peróxido de hidrógeno en infecciones con BGD en el pez cebra. (Bowker & Erdahl, 1998; Lumsden *et al.*, 1998; Varga & Murray, 2016).

1.4.3. Aerocistitis bacteriana (infección bacteriana de la vejiga natatoria)

Son comunes las infecciones bacterianas y fúngicas de la vejiga natatoria en varias especies de peces, como también se han observado infecciones bacterianas crónicas severas de este órgano (aerocistitis) en instalaciones de pez cebra y en algunos casos se presenta una alta mortalidad. Es posible encontrar infecciones mixtas por *Aeromonas* sp. y *Pseudomonas* sp. También se han informado aislamientos de bacterias similares en la cavidad visceral como *Vibrio cholerae*. El examen de las secciones histológicas con tinciones especiales puede revelar una variedad de tipos bacterianos en los que es posible encontrar *Pseudomonas fluorescens* en las vejigas inflamadas de peces cebra ya que poseen una vejiga natatoria abierta (fisóstomos) que se conecta al tracto gastrointestinal a través de un conducto neumático, condición que permitiría que las bacterias intestinales colonicen la vejiga natatoria de un huésped susceptible (por ejemplo, inmunocomprometido). Los factores estresantes conocidos, como el manejo (por ejemplo, el desove por compresión) puede ocasionar la aparición de la enfermedad. Se han informado casos de brotes en instalaciones de peces cebra donde también exhibieron Microsporidiosis del músculo. Los microsporidios son causas bien reconocidas de infecciones oportunistas en huéspedes inmunosuprimidos, que pueden ocurrir sin estar relacionados con causas iatrogénicas como también en las infecciones de la vejiga natatoria, donde existe la posibilidad de que los peces se vuelvan susceptibles a la aerocistitis después de ser inmunosuprimidos por agentes desconocidos o una deplorable calidad del agua (Aho *et al.*, 1988; Blaylock *et al.*, 2001; Bowater *et al.*, 2003; Bruno, 1989; Lehmann *et al.*, 1999; Miyazakai *et al.*, 1984; Wada *et al.*, 1993).

En relación a los signos clínicos y patología los peces afectados pueden estar letárgicos y acumularse cerca del fondo del tanque, lo que es consistente con el deterioro de la vejiga natatoria. Los peces a menudo exhiben eritema en la base de las aletas y en algunos casos también hemorragia que son característicos de la septicemia gram negativa y alguna enfermedad viral como el megalocitivirus (ISKNV) que causa la necrosis infecciosa de bazo y riñón, y por lo tanto no son patognomónicos para esta afección (Bermudez *et al.*, 2018).

En una evaluación histológica al microscopio óptico es posible observar una destrucción masiva e inflamación crónica severa de la vejiga natatoria. La lesión a menudo se extiende a lo largo de la cavidad visceral y dorsalmente a través del riñón hasta el músculo esquelético. El tejido presenta una necrosis prominente y mediante tinciones de Gram es posible encontrar colonias de bacterias, aunque las bacterias filamentosas no siempre se observan por tinción de Gram. Estas bacterias, también conocidas como bacterias deslizantes, pertenecen a los géneros *Flexibacter*, *Flavobacterium*, o *Cytophaga*. En tinciones ácido rápido que incorporan azul de metileno puede visualizarse colonias de bacterias de tinción de azul (ácido-rápido negativo). La tinción de Steiner también es habitual para mostrar estos tipos de bacterias en secciones. *Flavobacterium psychrophilum* no puede verse fácilmente en secciones teñidas con hematoxilina o eosina o Gram, pero son visibles con una tinción de Giemsa (Kent *et al.*, 1998).

Para el diagnóstico en los cambios macroscópicos es posible confundirse con una septicemia Gram negativa. El diagnóstico, por lo tanto, debe basarse en la observación histológica de las lesiones características en la vejiga natatoria. Se deben considerar utilizar tinciones de Gram, Steiner o azul de metileno para demostrar la presencia de bacterias. El cultivo bacteriano no es confiable ya que no ha sido identificada una especie bacteriana específica que causa la enfermedad (Kent *et al.*, 1998).

Para el control debe considerarse que es preciso identificar la causa subyacente de esta enfermedad. Es probable que las bacterias sean oportunistas ya que la infección está asociada con varias especies bacterianas diferentes. Hasta que las causas de la aerocistitis no estén identificadas, se recomienda mantener aislados los peces afectados de otras poblaciones y asegurar que la calidad del agua sea óptima (Kent *et al.*, 1998).

1.4.4. *Edwardsiella ictaluri*

Este patógeno es una bacteria Gram negativa comúnmente conocida en acuicultura como enfermedad grave del bagre (Plumb, 1999). El pez cebrá es muy susceptible a este agente y, por lo tanto, se ha utilizado como modelo de vacuna (Petrie-Hanson *et al.*,

2007). Esta especie es generalmente bastante resistente a las bacterias Gram negativas oportunistas, como *Aeromonas* y *Pseudomonas*, pero *E. ictaluri* no se encuentra en esta categoría. Es un patógeno primario y, a diferencia de otras bacterias, simplemente contaminando el agua con esta bacteria, en el pez cebra da como resultado una enfermedad (Petrie-Hanson *et al.*, 2007). La transmisión natural se produce principalmente a través de la eliminación de bacterias de peces portadores o enfermos, o también por el canibalismo de peces muertos. Se considera que la principal fuente de infección son los peces infectados, en lugar del ambiente. Sin embargo, en el bagre, la bacteria es capaz de persistir en el medio ambiente sin peces una vez que se ha introducido en el medio acuático (Plumb, 1999). Se han informado brotes de esta infección en instalaciones de peces adultos como de producción y experimentación con embriones. Aunque se considera principalmente una enfermedad del bagre, la infección se ha notificado en otros peces de agua dulce (Plumb, 1999). Se ha observado en peces de acuario utilizados en investigaciones en universidades (Kent & Lyons, 1982) y *Danio devario* (Waltman *et al.*, 1985).

La signología es típica de las septicemias Gram negativas en peces, los peces infectados exhiben una alta mortalidad y un eritema difuso (enrojecimiento) de la piel. Mientras que las altas mortalidades ocurren a menudo después de la exposición, los estudios con bagre mostraron que algunos peces pueden seguir siendo portadores durante muchos meses (Plumb, 1999).

En la observación al microscopio óptico de muestras de los peces infectados se exhiben necrosis severa en los órganos viscerales, particularmente en el bazo y el riñón. También muestran una severa y extensa necrosis e inflamación del cerebro anterior, los nervios olfativos y las narinas. Las narinas han demostrado ser una ruta importante de infección en el bagre (Plumb, 1999). El examen con gran aumento de las secciones de pez cebra muestra numerosos bacilos bacterianos en los fagocitos en las lesiones, así como en el riñón y el bazo.

El diagnóstico presuntivo se obtiene con muestras de secciones teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) y se basa en la observación de zonas necróticas en el cerebro anterior y nervios, con numerosos bacilos en los fagocitos. El diagnóstico definitivo se obtiene mediante el cultivo y la identificación por pruebas bioquímicas de las bacterias. Estas crecen de forma lenta en cultivo en comparación con muchas otras Gram negativas que se encuentran en los peces. Se han observado infecciones simultáneas con *Aeromonas hydrophila* en el bagre y esta condición también puede ocurrir en el pez

cebra, y por lo que hace que el diagnóstico sea más difícil ya que *A. hidrofília* crece más rápido en un cultivo que la *E. ictaluri* (Hawke *et al.*, 1981; Waltman *et al.*, 1986).

Edwardisella ictaluri se desarrolla bien en agar sangre y en agar de infusión cerebro-corazón. Se han realizado cultivos de muestras de pez cebra a 25-30 °C, pero se requirieron de 5 a 7 días para visualizar colonias prominentes. Hasta ahora, las cepas aisladas del pez cebra no son móviles y es diferente de la mayoría de las cepas de bagre. Se puede obtener un diagnóstico confirmatorio adicional mediante la utilización de la PCR (Nusbaum & Morrison, 2002).

El mejor método de control es evitar la introducción de peces infectados mediante la implementación de programas de cuarentena y la adquisición de embriones (huevos). Afortunadamente, no existen muchos informes de infecciones y de considerarse una enfermedad muy extendida en el pez cebra, y los brotes conocidos fueron identificados y aislados en cuarentena antes de que los peces fueran introducidos en una instalación principal. La infección es común en el bagre y se ha informado en especies de peces de acuario. Por lo tanto, se debe tener especial cuidado cuando se obtienen peces con el fin de realizar experiencias provenientes de comercios de venta de peces de acuario. Como la bacteria es muy patógena y no está muy extendida en el pez cebra, se recomienda que las poblaciones infectadas se sometan a eutanasia y que se desinfecten todos los equipos. Los antibióticos utilizados para controlar la infección en el bagre y pez gato incluyen la administración oral de oxitetraciclina u ormetoprim-sulfadimetoxina. Otros medicamentos que se han probado in vitro incluyen kanamicina, estreptomycin y ácido oxolínico (Noga, 2010).

1.5. ENFERMEDADES POR MOHOS DE AGUA (SAPROLEGNIOSIS, OOMICETOS) Y PROTOZOARIAS

Las enfermedades causadas por protozoos son comunes en los peces de acuario, y varios se han observado en el pez cebra. Los mohos de agua se componen de muchos géneros de organismos similares a hongos pertenecientes a la clase Oomicetes, también conocidos como "pseudohongos", que comúnmente infectar a los peces de agua dulce. Clase Oomicetes pertenece al reino / supergrupo Chromista, que históricamente ha incluido en el Reino Protista. Hay tres órdenes de clase Oomicetes que pueden infectar peces, los Saprolegniales, Leptomitales y Peronosporales. Los organismos dentro la familia Saprolegniaceae son patógenos más comunes en peces. Los patógenos primarios *Ichthyophthirius multifiliis* que causa "Ich" o enfermedad de la mancha blanca " y *Piscinoodinium pillulare* que causa "la enfermedad del terciopelo de agua dulce" son

muy comunes en los peces cautivos de aguas cálidas y causan enfermedades en instalaciones de experimentación o producción de pez cebra. Los microsporidios son generalmente más específicos del hospedador y son parásitos intracelulares obligados productores de esporas con más de 150 especies infecciosas para los peces y muy comunes en los bioterios de producción de peces cebra. La microsporidiosis se informó por primera vez en el pez cebra, *Danio rerio*, hace casi 30 años (De Kinkelin, 1980), y este microsporidium se asignó recientemente a un nuevo género y especie, *Pseudoloma neurophilia* (Matthews *et al.*, 2001). La microsporidiosis, la enfermedad más común del pez cebra de laboratorio, afecta el sistema nervioso central y el músculo esquelético, y se asocia con emaciación, deformidad espinal y morbilidad. Las esporas de *Pseudoloma* están contenidas dentro de los complejos huésped-parásito conocidos como xenomas. Las infecciones por *Pseudoloma* se caracterizan por múltiples xenomas en el cerebro posterior, la médula espinal, las raíces nerviosas y ocasionalmente dentro del músculo esquelético. Las esporas libres (probablemente provenientes de la ruptura del xenoma) se encuentran dentro de los fagocitos y se asocian con miositis, meningitis y encefalitis severas y crónicas. El tejido ovárico a menudo está infectado y ocasionalmente los huevos pueden albergar esporas de *Pseudoloma* que indican potencial de transmisión vertical (Kent & Bishop-Steward, 2003; Ramsay, 2009).

1.5.1. Enfermedad de terciopelo (*Piscinoodinium pillulare*)

El parásito *Piscinoodinium pillulare*, que causa de la “enfermedad del terciopelo”, es un dinoflagelado amarillento que durante una etapa de su ciclo de vida infecta la piel y las branquias de los peces. El parásito puede multiplicarse muy rápidamente en acuarios y puede ser mortal para los peces. Este es un patógeno común de los peces ornamentales o de acuario. Durante la etapa de dinospora infecta a los peces y se transforma en trofote, que se adhiere a la superficie de los peces, especialmente en las branquias, y aparentemente se alimenta del epitelio del huésped. Después de varios días abandona el huésped y forma un tomonte y en esta etapa de huésped externo (forma de división enquistada) experimenta varias divisiones, que da como resultado 256 dinosporas móviles infecciosas que infectan a otros peces. El ciclo de vida se completa en aproximadamente 2 semanas y en condiciones óptimas (23-26 ° C) de temperatura del agua (Lom & Dykova, 1992; Noga, 1996).

En relación a los signos clínicos y patología, los peces muy infectados se ven letárgicos, pueden permanecer cerca de la superficie del agua y tener dificultad para respirar y la

coloración de los mismos puede exhibir un brillo de color grisáceo u oxidado en la superficie.

El examen al microscopio óptico de muestras de piel o de branquias revela numerosos trofontes no móviles opacos, ovalados (alrededor de 9-12 X 40-90 µm). En las secciones histológicas, el *Piscinoodinium* aparece como organismos ovalados en las branquias y en la superficie de la piel, con numerosos gránulos citoplásmicos (a menudo refractiles) y un núcleo grande. Las infecciones de las branquias se asocian con hiperplasia epitelial y de manera similar, las infecciones en la piel producen hiperplasia severa y erosión del epitelio.

La infección se diagnostica mediante la observación de los trofontes en muestras observadas al microscopio o secciones histológicas. Para el primero, *Piscinoodinium* se distingue de muchos otros protistas que infectan la superficie por su falta de motilidad. Para el control y tratamiento no se conocen informes de infecciones por *Piscinoodinium* en el pez cebra pero, si se observa infección por este agente, recomienda como tratamiento una inmersión prolongada en agua con sal (1 cucharadita / en 19 litros de agua). Las infecciones muy graves que ponen en peligro la vida de los peces pueden tratarse con un baño rápido (1-3 min) en agua de mar de concentración total (35 %). Al igual que con "*Ich*", la presencia de etapas de desarrollo fuera del huésped debe ser considerado al implementar un protocolo de tratamiento. Por lo tanto, es mejor capturar todos los peces y tratarlos en un acuario con agua limpia y por otro lado desinfectar el tanque original (Noga, 1996).

1.5.2. Microsporidiosis

La microsporidiosis neural por *Pseudoloma neurophilia* en el pez cebra se informó por primera vez en 1980 en Francia (Kinkelin, 1980). El parásito ahora ha sido identificado en muchas instalaciones de investigación y producción de peces cebra y fue asignado a un nuevo género y especie, *Pseudoloma neurophilia* (Matthews *et al.*, 2001). La infección está relacionada con una emaciación grave (también denominada "enfermedad flaca"), pero su rol preciso en cada caso (causa primaria) aún no se ha resuelto. En un estudio de dos poblaciones de peces cebra con una alta prevalencia de infección, en una se encontró que el 97% de los peces estaban flacos e infectados pero en la otra el 30% de los peces normales presentaron infección subclínica lo que demuestra que, al igual que con muchos parásitos, la infección también se puede encontrar de forma rutinaria en peces de apariencia normal y saludable. El hecho de encontrar emaciación y caquexia en el pez cebra no significa que estén afectados por infección. Factores como el estrés

por manejo inadecuado y hacinamiento provoca una mayor gravedad de la infección, un menor crecimiento y fecundidad en la colonia (Ramsay *et al.*, 2009).

Los microsporidios son parásitos similares a hongos intracelulares con un ciclo de vida complejo. El ciclo de vida concluye con la producción de una espora infecciosa, resistente y es la única etapa del parásito que puede vivir fuera de la célula huésped. Como la mayoría de los microsporidios, la transmisión se produce a través de la ingestión de la etapa de esporas infectantes, y encontrándose en peces adultos infectados a las cuatro semanas después de haber sido alimentados con tejidos contaminados con esporas. Algunos peces son muy susceptibles y pueden mostrar una forma aguda de la enfermedad y con una alta mortalidad, una semana después de haber sido expuestos al agente etiológico (Ferguson *et al.*, 2007). Si bien el parásito se transmite fácilmente al alimentarse de carcasas infectadas, se ha encontrado que también existe transmisión cuando los peces se mantienen físicamente separados, pero en la misma agua. Se piensa que esto puede deberse a que el elemento del huevo de pez cebra infectado, es liberado por las hembras infectadas, ya que los peces cebra frecuentemente se reproducen en condiciones naturales en el acuario. También se han notificado casos de transmisión vertical en otros microsporidios de vertebrados e invertebrados. Se han encontrado esporas de *Pseudoloma* en los ovarios y, a veces, en huevos de pez cebra inmaduros y degenerados, y el papel de la transmisión vertical o pseudovertical (transmisión a la progenie con el patógeno fuera del huevo) de *Pseudoloma* está actualmente bajo investigación (Bandi *et al.*, 2001; Dunn *et al.*, 2001; Phelps *et al.*, 2008; Varga & Murray, 2016).

Dentro de los signos clínicos puede observarse la emaciación y la curvatura de la columna vertebral, como la escoliosis, en los peces infectados. Sin embargo, estos signos clínicos no son patognomónicos de la enfermedad. Además, el pez cebra puede cursar en forma subclínica la enfermedad por lo que puede ser un portador sano y provocar graves infecciones de *P. neurophilia*, por lo que, el diagnóstico de microsporidiosis no debe hacerse solo por los signos clínicos presentes (Kent & Bishop-Stewart, 2003; Phelps *et al.*, 2008).

Para la observación de muestras al microscopio óptico debe considerarse que el sitio primario de la infección es el sistema nervioso central (médula espinal y cerebro posterior) y las raíces nerviosas. Luego la infección se extiende al músculo esquelético, donde causa inflamación severa, crónica y multifocal. También infecta los ovarios y los huevos, y ocasionalmente otros órganos, como el riñón (Kent & Bishop-Stewart, 2003).

Para el diagnóstico el agente causal puede detectarse en muestras en fresco del sistema nervioso central que se han diseccionado cuidadosamente de los peces infectados. Debido a que esto es una tarea tediosa y laboriosa, entonces la histología es el método de rutina mediante el cual se observa la lesión. Las esporas son ovoides a piriformes, con una vacuola posterior prominente, y tienen un promedio de $5.4 \times 2.7 \mu\text{m}$. El microsporidio produce xenomas dentro de la médula espinal y en el cerebro posterior de los peces. Los xenomas contienen vesículas esporóforas con hasta 16 esporas. Los esporoblastos y los estadios preesporoblastos (probablemente esporontos) se encuentran algunas veces como pequeños agregados dispersos al azar a lo largo de los xenomas. La tinción fluorescente Fungi-Fluor (Polysciences, Warrington, PA) se une inespecíficamente a los polisacáridos con enlace beta que se encuentran en las células que contienen quitina. Como la quitina aparece en las paredes de las esporas de los microsporidios, esta tinción es excelente para demostrar las esporas en frotis de tejido o en secciones histológicas. También se describe una tinción relacionada (Calcofluor) y otras técnicas de tinción para la identificación de microsporidios (Weber y col., 1999). Las tinciones ácido rápidas y Gram también son útiles para demostrar la presencia de esporas de microsporidios. También se han desarrollado pruebas de PCR para *P. neurophilia* de muestras de peces y actualmente existe una prueba de PCR para agua y huevos, sin necesidad de sacrificio de peces. En la actualidad es posible establecer una instalación que se puede mantener libre de la infección, usando este tipo de pruebas (Whippes *et al.*, 2006).

Para el control y tratamiento, la irradiación con luz ultravioleta (UV) es utilizada para controlar patógenos en sistemas de producción de pez cebra. La esterilización UV se ha empleado con éxito para matar virus, bacterias y protozoos en el agua antes de entrar en contacto con los peces. La mayoría de los sistemas utilizan esterilizadores UV después de la filtración biológica. Se ha demostrado que otras especies de microsporidios son muy susceptibles al tratamiento con UV y algunos estudios indican que la luz UV a $30\text{--}50,000 \mu\text{Wsec} / \text{cm}^2$ inactiva al parásito y, por lo tanto, evita su transmisión en un sistema de recirculación de agua. La fumagilina se ha utilizado también como tratamiento oral para la microsporidiosis de peces, generalmente con éxito (Shaw & Kent, 1999). La fumagilina se desarrolló por primera vez para tratar *Nosema Apis* que son infecciones en las abejas. También se informó que la fumagilina fue efectiva contra el microsporidio *H. anguillarum* en anguilas (*Anguilla japonica*) (Kano & Fukui, 1982). Desde el primer informe sobre el tratamiento de la microsporidiosis en peces con fumagilina, el medicamento ha sido utilizado para tratar las infecciones por *N. salmonis* en el salmón

Chinook (Hedrick *et al.*, 1991) y las infecciones por *Loma salmonae* en el salmón Chinook (Kent & Dawe, 1994). En investigaciones iniciales y más recientes con la utilización de este medicamento se informó que no tuvo éxito para controlar o reducir la infección en el pez cebra, pero se pretende continuar los estudios con dosis más altas, ya que no se han encontrado efectos secundarios con el medicamento (Varga & Murray, 2016). Las esporas pueden ser resistentes a los desinfectantes y los niveles de cloro utilizados habitualmente en el agua de las instalaciones del pez cebra (es decir, 25 o 50 ppm durante 10 minutos) no son efectivos para matar esporas. Además, se ha observado huevos llenos de esporas de *Pseudoloma* en cortes histológicos de ovarios. Las esporas dentro de los huevos intactos pueden protegerse del cloro, incluso si esta concentración es efectiva para matar esporas.

Según algunos estudios del parásito, en este momento del ciclo, las siguientes prácticas probablemente reducirían la propagación y el impacto de la infección 1) garantizar que el agua en los sistemas de recirculación se trate adecuadamente con esterilización UV, 2) en el caso de encontrar infecciones, eliminar por eutanasia a todos los peces que presenten signos de enfermedad lo antes posible para prevenir el canibalismo y una mayor transmisión, 3) considerar la detección en peces reproductores, particularmente hembras, para que el parásito reduzca el riesgo de transferir la infección a una instalación con su progenie, 4) criar peces potencialmente infectados en condiciones óptimas y reducir el estrés para minimizar el impacto de la infección, y 5) minimizar el potencial de contaminación cruzada de las poblaciones utilizando peces de tipo salvaje para cruzar con cada población mutante (Ferguson & col., 2007; Shaw *et al.*, 1999).

1.5.3. Enfermedad del Tetra Neón

Recientemente, se ha diagnosticado otro microsporidio llamado *Pleistophora hyphessobryconis*, en algunas instalaciones de investigación de pez cebra. Este parásito causa de la enfermedad de neón tetra e infectan una amplia variedad de especies de peces de acuario. La infección produce una cantidad masiva de parásitos y esporas en desarrollo en todo el músculo esquelético, pudiéndose encontrar también en otros órganos dentro de macrófagos. Por lo tanto debe evitarse contaminaciones de este parásito en las instalaciones de investigación o producción de pez cebra y se recomienda extremar las precauciones al usar peces cebra que hayan estado en contacto con otros peces de acuario, especialmente los tetras. El diagnóstico, control y el tratamiento es similar al desarrollado para *Pseudoloma*. Actualmente es posible detectar este agente mediante una prueba de PCR (Lom & Dykova, 1992; Varga & Murray, 2016).

1.5.4. Ich (enfermedad de la mancha blanca)

Esta enfermedad es causada por el ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) y es probablemente la enfermedad más importante que afecta a los peces de acuario de agua dulce. Afortunadamente, no se ha reconocido como un problema de infección importante en las instalaciones de investigación del pez cebra. Algunas similitudes en el ciclo de vida son compartidas entre el parásito Ich y *Piscinoodinium*. Ambos tienen estadios enquistados fuera del hospedador en los que se produce la multiplicación de organismos, seguidos por estadios de natación libre que infectan a los peces. Por el contrario, Ich penetra en el epitelio y, por lo tanto, dificulta su erradicación con baños externos o inmersiones (Dickerson & Dawe, 1995; Noga, 1996).

Los peces con infecciones graves presentan una producción excesiva de mucílago (mucoproteína), dificultad para respirar y letargo. Un signo patognomónico de la enfermedad son los nódulos blancos y elevados en la piel, por lo que también, la enfermedad es conocida como "mancha blanca" (Dickerson & Dawe, 1995; Noga, 1996).

En las preparaciones de muestras frescas en portaobjeto de piel y branquias puede observarse ciliados móviles que varían en tamaño, desde la etapa inicial de infección hasta la etapa incrustada bajo el epitelio, que alcanza hasta 1 mm de diámetro. Las muestras histológicas muestran el parásito bajo el epitelio asociado con hiperplasia epitelial severa. Un macronúcleo grande en forma de herradura puede ser visible en muestras de tejido fresco (Dickerson & Dawe, 1995; Noga, 1996; Varga & Murray, 2016). Para el diagnóstico, la observación de ciliados activos de tamaño variable en montajes húmedos de la piel o branquias es un buen diagnóstico presuntivo. El diagnóstico definitivo se logra mediante la observación del macronúcleo distintivo y la observación de parásitos bajo el epitelio de las branquias o la piel. (Dickerson & Dawe, 1995; Noga, 1996; Varga & Murray, 2016).

En relación al control y tratamiento existe información disponible sobre estrategias de control para "Ich", y el tratamiento más común es un baño externo con formol. Por lo general, los peces se tratan con formol a aproximadamente 1: 5000 de formol durante 1 hora. Cada especie de pez responde de manera diferente al baño con solución de formol y por lo tanto, en cada especie de pez debe estudiarse antes de aplicar el tratamiento en grandes cantidades. El tratamiento debe realizarse con precaución, ya que las etapas debajo de la piel están algo protegidas de los baños externos. Entonces es posible que se puedan requerir tratamientos múltiples. Además, todo el sistema debe tratarse para destruir las etapas de hospedador del parásito, lo que puede ser perjudicial para las

poblaciones de bacterias (beneficiosas) de los filtros biológicos (Noga, 1996; Dickerson & Dawe, 1995; Varga & Murray 2016).

1.6 PARÁSITOS METAZOOS – CAPILLARIASIS

Los parásitos metazoarios (helmintos y artrópodos) causan enfermedades en los peces en cautiverio. Debido a que las colonias de pez cebra usualmente utilizan agua de ciudad decolorada y se mantienen en sistemas cerrados, los parásitos metazoos (particularmente aquellos que requieren de huéspedes intermedios) no son numerosos en estas instalaciones. Los nematodos capilaridos son uno de los pocos metazoos que se han reconocido como un problema en las instalaciones de pez cebra (Kent *et al.*, 2002; Pack *et al.*, 1995).

La especie que infecta el pez cebra fue identificada por primera vez como *Pseudocapillaria tomentosa*. Los capilarios infectan todas las clases de vertebrados y pueden ser patógenos debido a su naturaleza invasiva (Moravec, 1987; Moravec *et al.*, 1987^a; Williams & Jones, 1994). *Pseudocapillaria tomentosa* (sinónimo de *P. brevispicula*) tiene una amplia especificidad de hospedador y puede infectar alrededor de 25 especies de peces de la familia Cyprinidae y miembros de otros órdenes como Aguilliformes (Anguilas), Gadiformes (bacalaos), Salmoniformes (Salmones) y Siluriformes (bagres) (Moravec, 1987). Este patógeno fue relacionado con la mortalidad en las púas del pez tigre (*Puntius tetrazona*) (Moravec *et al.*, 1984). Existen otros parásitos relacionados que también causan enfermedades en peces de acuario como ser *Capillaria pterophylli* que ha sido reconocida como un patógeno común del pez ángel en cautividad y los peces disco (Richenbach-Klinke, 1952) y *Capillostogyloides ancistri* es un patógeno para el bagre de la especie *Ancistrus dolichopterus* (Moravec *et al.*, 1987b). Se ha demostrado que los oligoquetos (p. Ej., *Tubifex tubifex*) pueden servir como hospedadores paraténicos para *P. tomentosa* en estudios de transmisión de laboratorio y también existe la transmisión directa entre animales en ausencia de gusanos como vía de infección. Todo lo expuesto confirma que el parásito puede proliferar en las instalaciones de investigación de pez cebra (Lomankin & Trofimeko, 1982).

En los signos clínicos y patología se observa que los peces con un grado de infección muy grande presentan una coloración oscura y se observan letárgicos. En la necropsia se puede observar hepatomegalia y anemia (Lomankin & Trofimeko, 1982).

Al microscopio óptico se observa que las hembras de *P. tomentosa* son de cuerpo alargado (7-12 mm) y fino, y aquellas grávidas están repletas de huevos que se visualizan en preparaciones de muestras frescas del intestino en un portaobjeto. Los

machos son más pequeños, alrededor de 4-7 mm de longitud. Las muestras histológicas revelan los gusanos dentro de la pared intestinal y a veces, se asocian con una celutitis grave de la región infectada. La reacción del tejido puede ser severa, difusa y extenderse por toda la cavidad visceral. También puede existir predisposición de los peces a desarrollar neoplasias intestinales (Kent *et al.*, 2002).

En el diagnóstico, la identificación de nematodos capilaridos se realiza fácilmente mediante la observación de los huevos, que son típicamente ovalados y contienen tapones bipolares distintivos. La identificación precisa a nivel de especie requiere un examen cuidadoso de los órganos sexuales masculinos, que son bastante pequeños en *Pseudocapillaria* spp. Las hembras de *P. tomentosa* miden aproximadamente 7-12 mm de largo mientras que los machos miden aproximadamente 4-7 mm. Solamente la infección por nematodos que se ha identificado en el pez cebra en instalaciones de investigación y producción es *P. tomentosa* (Kent *et al.*, 2002).

En relación al control y tratamiento los gusanos oligoquetos que son utilizados como alimento vivo pueden ser una fuente de infección y, por lo tanto, deben evitarse, especialmente si su fuente es desconocida. Como la transmisión directa también ocurre entre los peces, la infestación puede propagarse dentro de una población en forma rápida si no se controla. Si los peces no son muy valiosos, (por ej. peces transgénicos) la opción más apropiada sería eliminar a la población infestada. En la actualidad, la infestación no está muy extendida en las instalaciones de investigación, tal vez debido a la decoloración de los huevos y posterior eliminación de los mismos como también la implementación de los procedimientos de cuarentena. La ivermectina es un antihelmíntico muy eficaz para muchas infestaciones por nematodos y artrópodos en animales terrestres, y se ha empleado para tratar infestaciones por nematodos en peces (Heckman, 1985). Por lo tanto, la ivermectina debe considerarse como un posible tratamiento para *P.*

tomentosa en el pez cebra. Sin embargo, este medicamento no se ha probado aún en el pez cebra, y parece que hay una gran variabilidad en la tolerancia del medicamento incluso entre especies de peces estrechamente relacionadas, es decir, muchas especies de peces son altamente susceptibles a los efectos secundarios tóxicos de la ivermectina en las dosis utilizadas en mamíferos (Johnson *et al.*, 1993; Kilmartin *et al.*, 1997), probablemente debido a una barrera hematoencefálica comparativamente reducida que causa neurotoxicidad. Este medicamento también se ha asociado con problemas respiratorios en peces (Toovey *et al.*, 1999).

Los tratamientos orales o de baño con levamisol y fenbendazol también se han empleado para tratar infestaciones por nematodos en peces (Noga, 1996), pero Hoffman

(1982) descubrió que el levamisol no era eficaz para tratar infestaciones por capilaridos en peces carassius dorados y las crías de pez cebra tratadas con levamisol se vuelven estériles (Weaver *et al.*, 2016). Pack *et al.* (1995) informaron que una mezcla de triclorofon y mebendazol en forma de Fluke-Tabs (Aquarium Products, Glen Burnie, MD) agregado al agua elimina la infestación y los peces tratados aumentaron de peso y posteriormente no se observó infestación. También se ha informado el éxito en el tratamiento de infestaciones con *P. tomentosa* con pirantel y ajo en polvo incorporados en el alimento en una situación de producción (Weaver *et al.*, 2016).

1.7. Myxosporidiosis renal

Los parásitos mixozoos (Filum Myxozoa, clase Myxosporea) son parásitos comunes de los vertebrados de sangre fría, particularmente los peces (Kent *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, los Myxozoa se han clasificado con los Protozoos. Sin embargo, hace unos 15 años, el análisis de la subunidad del ADN ribosómico reveló que el Myxozoa estaba conectado con el reino Animalia. Dos puntos de vista han predominado en estas discusiones. Uno sugiere que los mixozoos están más estrechamente relacionados con la Cnidaria (diploblastos), debido a las similitudes morfológicas y de desarrollo de sus cápsulas polares y nematocistos respectivamente. Estas observaciones y el análisis filogenético en apoyo de ellas se presentaron por primera vez en una publicación clave de Siddall *et al.* (1995). Otros análisis sostienen la proximidad filogenética a los animales bilaterianos (triploblastos) (Zrzavy *et al.*, 2003).

Hay más de 2.200 especies descritas de mixozoos, y la mayoría son relativamente no patógenas (Lom & Dyková, 2006). Las que infectan la luz de los órganos se denominan especies coelozoicas. Estos se encuentran comúnmente en la vesícula biliar, los conductos biliares o el tracto urinario, y con frecuencia causan poco daño en los tejidos. Las especies histozoicas (las que infectan en el interior de los tejidos) generalmente forman pequeños quistes blancos confinados con poco daño tisular asociado. Sin embargo, cuando estos quistes son numerosos en órganos vitales, como las branquias o el corazón, pueden causar enfermedades. El ciclo de vida de los mixozoos es complejo pues poseen varias etapas vegetativas (trofozoitos) y el desarrollo en los peces culmina en la formación de esporas multicelulares, llamadas myxosporas. La morfología de las esporas es el criterio principal utilizado para la identificación de los mixozoos. El desarrollo en un oligoqueto o poliqueto acuático es necesario para completar el ciclo de vida (Kent *et al.*, 2003). Las formas encontradas en los oligochaetes originalmente se consideraron parásitos diferentes, que se asignaron a la clase

Actinosporea. Debido a que estas etapas no son taxones separados de los mixozoos que se encuentran en los peces, la taxonomía del Filum Myxozoa se ha revisado (Kent *et al.*, 1994). Si bien las enfermedades mixozoicas graves se encuentran en peces silvestres o producidos con acceso a aguas abiertas, se observan con menos frecuencia en los bioterios de producción o experimentación de peces. Esto es probable debido a la necesidad del parásito de pasar a través de un gusano anélido para infectar a otro pez. Sin embargo, se ha informado la detección de un mixozoo, perteneciente al género *Myxidium* o *Zschokkella* en pez cebra en varias instalaciones de investigación (Kent *et al.*, 2009).

En la actualidad no se ha encontrado asociación de infecciones con enfermedad clínica. En las muestras histológicas que se observan al microscopio óptico de los peces infectados se puede encontrar el parásito en los conductos mesonéfricos y, en ocasiones, en la luz de los túbulos renales. Las infestaciones pueden ser graves, pero rara vez se asocian con cambios histológicos significativos. El organismo que se ve en el pez cebra se compone de un trofozoito multicelular (plasmodium) en el que mediante un examen cuidadoso se observa myxosporas adentro del mismo.

El rasgo distintivo que identifica a las myxosporas es la presencia de cápsulas polares, que se pueden visualizar mejor con tinciones de azul de metileno y Giemsa. Los géneros *Myxidium* o *Zschokkella* tienen miembros con cápsulas polares ubicadas en el extremo opuesto de las esporas (Kent *et al.*, 2009).

La infección se diagnostica mediante la observación del parásito en muestras histológicas. Con frecuencia, se utilizan preparados o montajes frescos de tejidos para visualizar las mixosporas al microscopio.

Para el control y tratamiento las infecciones en una instalación de pez cebra indican que el huésped oligoqueto está presente en el sistema de agua (por ejemplo, tanques o filtros). Se ha informado de pequeños oligoquetos (por ejemplo, *Stylaria* spp.) en el sistema de agua de instalaciones de pez cebra. Además, los oligoquetos utilizados para alimentar a los peces (por ejemplo, lombrices negras o lombrices rojas) pueden ser fuentes de infecciones por mixozoos en los peces que se encuentran en acuarios. La fumagilina y algunos otros fármacos muestran una eficacia variable para el tratamiento de las infecciones por el mixozoo.

El tratamiento del mixozoo en los peces cebra probablemente no sea justificado ya que no es un patógeno importante (Hallett *et al.*, 2005).

2. CONTROL SANITARIO EN COLONIAS DE PECES CEBRA DE BIOTERIOS DE ARGENTINA

FUNDAMENTACIÓN DEL PROYECTO

El pez cebra, (*Danio rerio*) actualmente se considera un modelo animal de elección en ensayos de desarrollo embrionario, análisis de la función genética y mutagénesis. Las características que posee como ser una alta fecundidad, fertilización externa y mecanismos moleculares del desarrollo del embrión similares a todos los vertebrados, permitieron que el pez cebra se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior de elección.

Muchos de los agentes que afectan al pez cebra y que pueden alterar los resultados en las investigaciones son patógenos (primarios y oportunistas) que pueden causar infecciones subclínicas pero que en condiciones de estrés, técnicas de manejo deficiente y la mala calidad del agua pueden desarrollar enfermedad. Los signos de infección pueden incluir una ligera disminución en la eficiencia reproductiva, una reducción en el apetito o el crecimiento y / o un aumento en la mortalidad en las colonias. Los peces utilizados en experimentación con un status sanitario desconocido pueden ser un riesgo potencial para la salud de las personas que los utilizan y dar resultados experimentales erróneos, dificultades para la reproducibilidad de la experiencia y la utilización innecesaria de más animales para demostrar significación estadística. Por lo tanto es necesario aplicar medidas para mitigar ese riesgo y asegurar que los resultados de la investigación realizada estén libres de variables no controladas.

En nuestro país son varias las instituciones públicas y privadas que utilizan este modelo animal en sus investigaciones pero no se tiene registro de controles sanitarios en las colonias de peces por falta de laboratorios de diagnóstico que los realicen y que deberían realizarse con una frecuencia de 3 meses en animales libres de patógenos específicos (SPF) o cada 6 meses en animales convencionales (libres de zoonosis).

Las técnicas diagnósticas disponibles a implementarse pueden ser reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cultivos bacteriológicos y exámenes directos o parasitológicos. Una combinación de estas técnicas y un examen general de los animales contribuirá a disponer de un perfil sanitario completo de la colonia de peces.

3. HIPÓTESIS

Las colonias de producción e investigación de instituciones públicas y privadas de la República Argentina que utilizan el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal, están

contaminadas con agentes patógenos debido a la escasa implementación de barreras sanitarias y falta de controles sanitarios en los animales.

4. OBJETIVO GENERAL

Conocer el estado sanitario mediante la investigación de agentes patógenos prevalentes, utilizando técnicas bacteriológicas, parasitológicas y moleculares y las barreras sanitarias implementadas en las colonias de peces cebras de producción e investigación de instituciones públicas y privadas de la República Argentina.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer el estado de salud de las colonias de peces de las instituciones que serán estudiadas en este trabajo.
2. Informar cuales son las barreras sanitarias implementadas en las colonias de peces estudiadas en este trabajo.
3. Estandarizar técnicas bacteriológicas y parasitológicas para la detección de agentes patógenos en el pez cebra.
4. Desarrollar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN bacteriano y parasitario en peces cebras provenientes de diferentes colonias.
5. Informar el porcentaje de muestras positivas de agentes patógenos en las colonias de peces cebras de nuestro país.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Muestreo

Las muestras (peces) se obtuvieron de 6 instituciones públicas y privadas de nuestro país y se realizó un control sanitario de las mismas. Los peces se sacrificaron en cada institución y luego fueron enviados congelados (-10 °C) hasta el laboratorio (LAE) donde fueron analizados para los agentes patógenos para pez cebra que se detallan a continuación (Tabla 4). Para el control sanitario se desarrollaron e implementaron técnicas bacteriológicas (cultivo), parasitológicas (observación directa de las muestras en

el microscopio) y moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el diseño de cebadores específicos para cada agente.

Tabla 4: Agentes patógenos de peces ceбра y técnicas utilizadas que se controlan en las instalaciones del LAE

Control sanitario en Pez Ceбра (<i>Danio rerio</i>)	
Bacterias	Técnica
<i>Aeromonas hydrophila</i>	PCR
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	PCR
<i>Flavobacterium columnare</i>	PCR
<i>Mycobacterium</i> spp. (<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. avium</i>)	PCR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cultivo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PCR/Cultivo
<i>Citrobacter freundii</i>	PCR/Cultivo
Parásitos	
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	PCR
<i>Pleistophora hyphessobryconis</i>	PCR
<i>Pseudoloma neurophilia</i>	PCR

El procedimiento estándar al recibir los animales consistió en realizar una anamnesis detallada mediante una planilla para el envío de muestras, que se completó mediante el contacto con los responsables de las instituciones involucradas con preguntas basadas en los criterios establecidos por el programa de vigilancia de la salud de los animales y en las recomendaciones internacionales del Consejo Internacional para la Ciencia Animal de Laboratorio (ICLAS) y la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA).

Se determinó el tamaño de la muestra por la siguiente fórmula estadística: $A = \alpha \log\text{-}\log / (1-P)$

A = tamaño muestra, P = porcentaje de animales infectados en la colonia y α = límite de confianza. Siendo $P = 0.25$, $\alpha = 0.05$ y $A = 10$ animales, la probabilidad de detectar al

menos un animal positivo en la muestra evaluada fue del 95% (Instituto de Investigación en Animales de Laboratorio) ILAR, 1976; Nicklas, 2002).

El número de instituciones que producen y/o trabajan con peces cebras en nuestro país son escasas (6-7 bioterios de pez cebra en total). Se determinó que el número de muestras representativo de cada institución fue de 10 ejemplares, por lo que el número total de animales controlados fue de 60 individuos para la investigación de agentes patógenos por observación al microscopio óptico, como así también el cultivo bacteriológico en placas de agar, mientras que las pruebas moleculares por PCR se utilizaron 6 muestras en total (un pool de 10 animales por muestra), una de cada bioterio.

5.2 Procesamiento de las muestras y técnicas de diagnóstico

Se tomaron muestras de los pescados y se utilizaron en diferentes técnicas de diagnóstico. El resto del cuerpo de cada animal se congeló a -20 °C en caso de ser necesario realizar una nueva toma de muestra.

5.2.1 Microscopía óptica de campo claro (parásitos y bacterias)

La búsqueda y observación de parásitos (*Ichthyophthirius multifiliis*) se realizó mediante el montaje de una muestra de tejidos (arcos branquiales) de cada individuo (60 muestras) en un porta objeto con cubre objeto y la observación al microscopio se realizó con un aumento de 10X.

En las muestras (pooles) que dieron positivo a *Mycobacterium spp* por PCR, se tomaron muestras nuevas y se realizó una coloración de Ziehl-Neelsen y la observación del campo al microscopio (100X) se realizó utilizando la técnica de cruz griega.

5.2.2 Cultivo bacteriológico, aislamiento e identificación fenotípica

Los tejidos de cada una de las 60 muestras se procesaron en un mortero y 0,5 gramos y de la misma se sembró en agar Cetrimide para aislar *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para *Streptococcus pyogenes* se utilizó agar sangre y agar Mac. Conkey para la investigación de *Citrobacter freundii*. Las placas con las muestras sembradas fueron incubadas a 37°C durante 24-48 horas en una estufa de cultivo (Hirayama-JICA).

Para la identificación de género y especie de los medios donde hubo desarrollo de colonias se utilizaron pruebas bioquímicas.

Prueba	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>
Producción de fluoresceína	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	-
Ureasa	+	-

5.2.3 Técnica de PCR (parásitos y bacterias)

El ADN total fue extraído utilizando un equipo comercial para los *pooles* (Ultra Clean TM, Mo Bio Laboratories, Inc). Para la detección molecular se diseñó una PCR a partir de un alineamiento múltiple de secuencias del gen que codifica para una proteína específica de cada agente (Tabla 5).

Tabla 5: Detalle del perfil de los ciclos, tamaño del producto y secuencia de los agentes controlados por PCR.

Control de PCR	Tamaño del producto (pb)	Secuencia del iniciador (5'-3')	Perfil de los ciclos
<i>Streptococcus pyogenes</i> 297 pb			
Forward primer		GACTAATGCTATCGAAGAAGTTTCTG	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 55°C por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		GTATCTAATATGTCGTAATC	
<i>Pseudoloma neurophilia</i> 788 pb			
Forward primer		GAAAATTACCGGAGCCTGAAGTC	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 57°C por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		TTCCCTCTCTCTCCAAATTCGG	
<i>Pleistophora hyphessobryconis</i> 1311 pb			
Forward primer		CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		TCTCGCTTGTTCGCGCCTGA	
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i> 193 pb			
Forward primer		AGTGACAAGAAATAGCAAGCCAGGAG	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		ACCCAGCTAAATAGGCAGAAGTTCAA	
<i>Flavobacterium columnare</i> 512 pb			
Forward primer		TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAGAGACA	95°C por 4 min (95°C por 30 s, por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		TAATCTAAAGATGTTCTTTCTACTTGTTG	
<i>Edwardsiella ictaluri</i> 470 pb			
Forward primer		CAGATGAGCGGATTTACAG	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 54°C por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		CGCGCAATTAACATAGAGCC	
<i>Aeromonas hidróphila</i> 133 pb			
Forward primer		GCCGAGCGCCCAGAAGGTGAGTT	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		GAGCGGCTGGATGCGGTTGT	
<i>Mycobacterium</i> spp. 922 pb			
Forward primer		CGAACGGGTGAGTAACACG	95°C por 4 min (95°C por 30 s, 60°C por 1min, 72°C por 30s) x 35 ciclos
Reverse primer		TGCACACAGGCCACAAGGGA	

Para la reacción de PCR se utilizaron 5 µl de ADN molde adicionado a la mezcla de reacción (volumen final de 25 µl) constituida por 12 µl de GoTaq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, USA), 6,5 µl de agua libre de nucleasas y 0,75 µl de cada uno de los cebadores específicos para cada agente.

Se optimizó la amplificación utilizando diferentes tiempos y temperaturas de ciclado. El protocolo final para todos los cebadores consistió en un ciclo de desnaturalización de 4

minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos y un protocolo específico de amplificación para cada agente (Tabla 4).

El producto final obtenido de cada amplificación se corrió en un gel de agarosa al 1,5% a 100 V durante 45 minutos, se tiñó con SYBR Green (Invitrogen. USA) y se visualizó con un transiluminador de luz azul (Safer Image 2.0; Invitrogen. USA). En todos los casos se utilizó un control positivo de ADN de muestras de peces cebrá y lebistes (*Poecilia reticulata*) que dieron resultados positivos (en la banda correspondiente de pares de bases) para cada agente y, como control negativo, se colocó agua libre de nucleasas en lugar del molde de ADN.

6. RESULTADOS

En relación a la existencia de controles sanitarios, así como la implementación de barreras sanitarias en las instituciones involucradas en el trabajo se observó (en base a la información recibida de las instituciones involucradas) que no se había realizado un control sanitario en las 6 colonias de peces desde la adquisición de los mismos y que se sitúa en promedio en una fecha anterior a 5 años a la actualidad. Se observó que la implementación de barreras sanitarias en las instituciones/bioterios de peces estudiados fueron: el filtrado del agua (mediante filtros de lana de perlón y de grava en forma externa al tanque o pecera donde están los peces) se realizó en 6 bioterios; el uso de guantes y desinfección de los mismos antes de comenzar las tareas se informó en los 6 bioterios (pero no se especifica la desinfección previa durante las tareas que implican ingresar la mano en diferentes tanques con peces y en 3 bioterios no fue informado el uso de guantes de manga larga; la desinfección del agua con tubos de luz UV (como germicida) solo se informó en 1 bioterio y el uso de tanque o pecera de cuarentena para los peces de reciente adquisición se informó en 3 bioterios.

En relación a los agentes controlados en este trabajo la búsqueda y observación de parásitos (*Ichthyophthirius multifiliis*) mediante la observación al microscopio no se hallaron resultados positivos. En las muestras que fueron positivas a *Mycobacterium spp* por PCR no se obtuvieron resultados positivos con la coloración de Ziehl-Neelsen y la observación del campo al microscopio.

El cultivo en agar cetrimide permitió el desarrollo bacteriano, aislamiento y mediante pruebas bioquímicas se realizó la identificación fenotípica de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* a partir de las muestras de tejidos de peces (Figura 6 y 7).

Del total de peces estudiados (60 peces), resultaron 54 muestras positivas para *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* siendo el 90% de peces positivos

para dichos agentes en el total de muestras controladas (Figura 12). No se encontraron resultados positivos para *Streptococcus pyogenes* en agar sangre y tampoco para *Citrobacter freundii* en agar Mac. Conkey.

La técnica de PCR desarrollada permitió detectar una banda de pares de bases específicas de acuerdo con el tamaño esperado en cada agente, a partir de las muestras de colonias de peces y en el control positivo, mientras que no se observó amplificación en el control negativo (Figuras 8, 9, 10 y 11).

De las 6 muestras de *pooles* de 10 peces donde cada una se corresponde con un bioterio, las 6 fueron positivas para *Aeromonas hydrophila* (Figura 8) y se corresponden con los 6 bioterios analizados y lo que indica que el 100% de las muestras controladas dieron resultado positivo y por lo tanto todos los bioterios controlados tienen al menos un animal positivo para ese agente. De las 6 muestras de peces controladas en 3 se detectó *Mycobacterium* spp. (Figura 9) que se corresponde con un 50% de muestras positivas para ese agente en los bioterios analizados. *Pseudoloma neurophila* (figura 10) se detectó en 2 muestras con 33,33% de muestras positivas mientras que *Ichthyophthirius multifiliis* (Figura 11) dio positivo en 2 de las muestras analizadas con 33,33% de muestras positivas para ese agente. No se encontraron resultados positivos para *Streptococcus pyogenes* y tampoco para *Citrobacter freundii* por la técnica de PCR. A partir de los resultados obtenidos se realizó un diseño estadístico de barras (Figura 12) donde se detalla el porcentaje de muestras positivas y que permite una mejor interpretación.



Figura 6. Desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* en cultivo en placa en agar cetrimide.

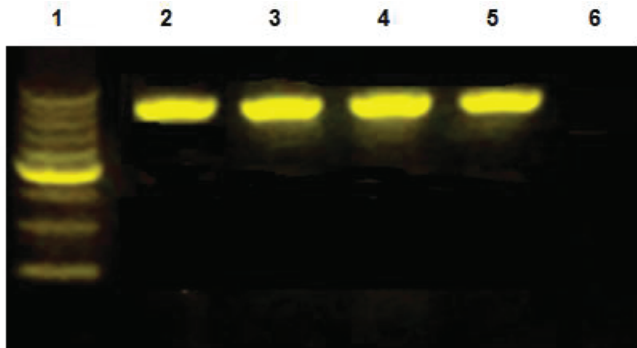


Figura 7. Desarrollo de *Pseudomonas fluorescens* en cultivo en placa en agar cetrimide y expuesto a luz UV.



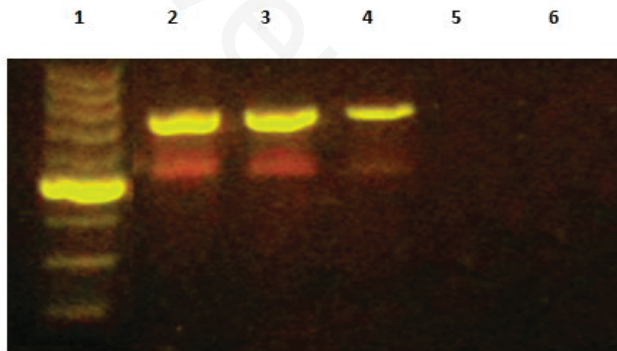
Columna 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Biodinamics);
Columna 2: muestra n° 1; **Columna 3:** muestra n°2; **Columna 4:** muestra n°3; **Columna n°5:** control positivo *Aeromonas hydrophila*;
Columna n°6: control negativo.

Figura 8. Control de *Aeromonas hydrophila* por PCR en gel de agarosa (1,5%) y transiluminador de luz azul.



Columna 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Biodinamics);
Columna 2: Muestra n° 1; **Columna 3:** muestra n°2;
Columna 4: muestra n°3; **Columna n°5:** control positivo
Mycobacterium spp; **Columna n°6:** control negativo.

Figura 9. Control de *Mycobacterium* spp. por PCR en gel de agarosa (1,5%) y transiluminador de luz azul.



Columna 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Biodinamics);
Columna 2: control positivo *Pseudoloma neurophilia*; **Columna 3:** muestra n°1; **Columna 4:** muestra n°2; **Columna n°5:** muestra n°3; **Columna n°6:** control negativo.

Figura 10. Control de *Pseudoloma neurophilia* por PCR en gel de agarosa (1,5%) y transiluminador de luz azul.

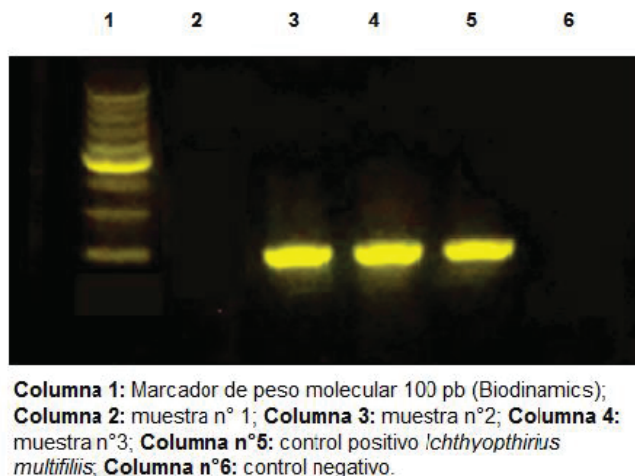


Figura 11. Control de *Ichthyophthirius multifiliis* por PCR en gel de agarosa (1,5%) y transiluminador de luz azul.

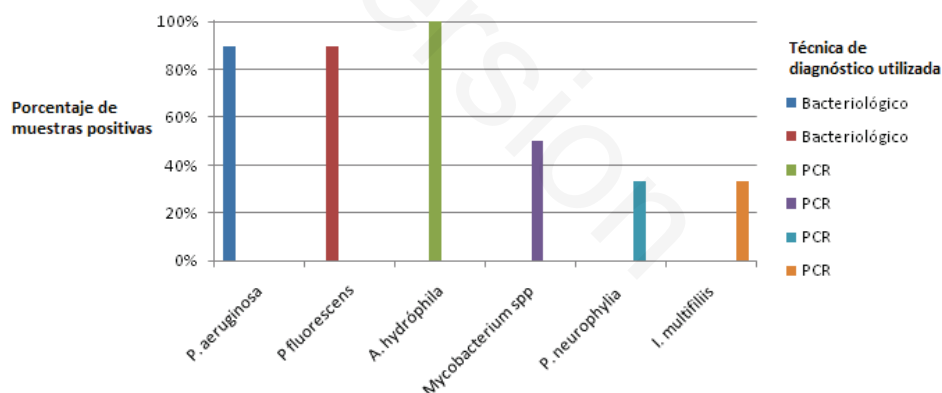


Figura 12. Porcentaje de muestras positivas de los diferentes agentes patógenos hallados en las muestras controladas y la técnica utilizada. Para *Mycobacterium* spp. e *Ichthyophthirius multifiliis* también se utilizó microscopía óptica pero sin resultados positivos, así como para *Streptococcus pyogenes* y *Citrobacter freundii* se utilizó bacteriología y PCR pero tampoco hubo resultados positivos y no se detalla en el gráfico.

7. CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos las colonias de peces cebras (*Danio rerio*) de las instituciones estudiadas en este trabajo y que utilizan esta especie como modelo animal, están contaminadas con agentes patógenos (primarios y oportunistas) según se detalla en la figura 12, debido a la escasa implementación de barreras sanitarias y la falta de un programa de control de salud.

8. DISCUSIÓN

Aproximadamente el 80% de todos los animales utilizados en la investigación son roedores, en comparación con el 10% que son acuáticos. En relación al uso más extenso de los roedores como animales de laboratorio, es necesario comparar los dos grupos animales con respecto a las enfermedades infecciosas. Se ha reconocido a lo largo de los años que utilizar con ratones libres de patógenos (SPF) en investigaciones es importante para minimizar variables en los resultados y generar resultados precisos. Aunque algunos investigadores se resisten, este concepto se está aceptando gradualmente por biomédicos de animales acuáticos de laboratorio que usan el pez cebra como modelo animal. El impacto en los resultados de la investigación, incluso para las enfermedades más comunes encontradas en bioterios de pez cebra, no se conoce o describen bien como ocurre en los roedores de experimentación. La preocupación por las enfermedades infecciosas en los peces de experimentación está aumentando a medida que los recursos en las instituciones de investigación se están centralizando, donde la ruptura de barreras de bioseguridad podrían conducir a una rápida propagación de agentes patógenos. Además de las enfermedades agudas que causan morbilidad y mortalidad severas, las condiciones crónicas subyacentes que causan infecciones de bajo grado o subclínicas pueden alterar los resultados de la investigación. En este trabajo se observó que hubo implementación de barreras sanitarias en los bioterios de peces estudiados, pero en algunos las mismas fueron deficientes. En todos los bioterios fue informado el filtrado del agua (mediante filtros de lana de perlón y de grava en forma externa al tanque o pecera donde están los peces). También se informó el uso de guantes y desinfección de los mismos antes de comenzar las tareas pero no se especifica la desinfección previa durante la rutina de trabajo de ingresar la mano en diferentes tanques con peces y solo en 3 bioterios no se informó que se usan guantes de manga larga para trabajar; la desinfección del agua con tubos de luz UV (como germicida) para mejorar la calidad del agua solo se informó en 1 bioterio y el uso de tanque o pecera de cuarentena para los peces de reciente adquisición se informó en 3 bioterios. Mientras que la aparición de enfermedades

subyacentes que causan bajas mortalidades puede ser aceptable para la acuicultura de producción (peces comestibles) o con peces ornamentales, deben evitarse en aquellos utilizados en la investigación en los cuales deben implementarse barreras sanitarias más estrictas. Los peces ornamentales que se comercializan generalmente se crían en estanques al aire libre y, a menudo, se infectan con una variedad de microorganismos patógenos y parásitos. Si bien estos a menudo no causan enfermedades clínicas, como se mencionó anteriormente, estas infecciones deben evitarse si los peces se usan para la investigación. Por lo tanto, las estrategias de cuarentena para los peces destinados a la investigación son más complejas que las recomendadas para los peces destinados a un acuario doméstico o público. El estado de salud en la acuicultura de peces destinados a la alimentación también difiere del de los peces de investigación. Las infecciones subclínicas que no afectan la mortalidad y la conversión alimenticia pueden ser aceptables cuando el punto final es la producción de carne, pero deben evitarse, cuando sea posible, en animales de investigación, ya que pueden interferir en los experimentos y los resultados. Por ejemplo, un punto final importante en la salud del pez cebra es la fecundidad. Debe evitarse un microorganismo que causó la reducción de la fecundidad incluso si no es patógeno (Kent *et al.*, 2009).

En este trabajo se observó el hallazgo de diversos agentes patógenos primarios y oportunistas en las colonias de peces cebra de nuestro país como también la eficiencia de las metodologías utilizadas en la detección de las infecciones por estos agentes. En este sentido se encontró que existe un número importante de animales positivos (54 muestras) a *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* aislados mediante medios sólidos (agar cetrimide) e identificados mediante pruebas bioquímicas, siendo los agentes con mayor número de resultados positivos encontrados en las colonias de peces controladas (90%). Según estudios de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* estos microorganismos pueden establecer una infección letal en embriones de pez cebra y la respuesta del huésped a la infección depende de la etapa de desarrollo del embrión; como también se requiere de una carga bacteriana mayor a medida que acontece la respuesta inmune del huésped, siendo este un proceso complejo que requiere una serie de eventos coordinados, que incluyen la diferenciación funcional de las células inmunes, la expansión de las poblaciones de células inmunes y la expresión de otras funciones inmunes, como las proteínas del complemento. Es probable que tanto los macrófagos como los neutrófilos, sean importantes para combatir la infección por *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* en embriones (Clatworthy *et al.*, 2009). El control de contaminaciones de estos patógenos en los bioterios de peces cebra es importante al momento de realizar una producción

continúa de embriones que luego serán utilizados en experiencia y que puedan alterar resultados del ensayo debido a contaminaciones con estos agentes.

En los resultados de las muestras mediante el diagnóstico por la técnica molecular de PCR indicaron una infección activa de varios agentes patógenos primarios y/o secundarios. Los patógenos encontrados por esta técnica en los resultados poseen un porcentaje importante de casos positivos. En el agente *Pseudoloma neurophilia* se observó una incidencia de 33,33% siendo esta la enfermedad más prevalente del pez cebra de laboratorio. La infección generalmente se asocia con morbilidad pero, como lo fue en las muestras controladas en este trabajo, es muy común los peces infectados sean asintomáticos. Esto se basa en el examen de cientos de peces cebra de muchos laboratorios enviados al servicio de control sanitario durante años, que incluyeron peces aparentemente sanos para controles de salud de rutina (Matthews, 2004). El control de enfermedades infecciosas en los laboratorios de pez cebra generalmente implica la desinfección de huevos en cuarentena y cloro. Las esporas de microsporidiosis son duraderas y permanecen infecciosas durante largos periodos y los tratamientos con cloro utilizados para desinfectar los huevos de pez cebra han demostrado ser ineficaces para matar esporas de *P. neurophilia*. La optimización de las condiciones de cría puede ayudar a controlar enfermedades del pez cebra como la microsporidiosis. Los peces infectados a menudo parecen clínicamente sanos lo que sugiere que otro factor, como el ambiente de crianza, puede desempeñar un papel clave en la gravedad de las infecciones por *Pseudoloma* (Mathews *et al.*, 2001; Ransay *et al.*, 2009). Los bioterios contaminados con *Aeromonas hydrophila* según los resultados indican una prevalencia de 100% y como se indicó previamente es posible detectar este agente patógeno de pez cebra al igual que *Mycobacterium* spp. mediante la detección de muestras de peces o muestras del medio ambiente del sistema acuático. *A. hydrophila* también es un patógeno que tiene el potencial de ser introducido al importar animales, aunque su susceptibilidad al cloro hace que su eliminación sea más probable durante la desinfección rutinaria de la superficie del huevo de pez. Puede causar septicemia mortal en peces pero también parece ser más dañina para humanos de lo que se creía anteriormente, principalmente debido a su capacidad para producir una cantidad importante de virulencia, factores tales como enterotoxinas, proteasas, lipasas, su resistencia a muchos antibióticos comunes como la penicilina y ampicilina; y los efectos significativos que el huésped, incluida la citotoxicidad e inflamación masiva. En este trabajo los peces controlados no mostraron síntomas clínicos como hemorragias y distensión abdominal. Sin embargo, las lesiones histológicas pueden no ser observadas porque la forma aguda de la enfermedad puede matar los

peces antes de cualquier cambio anatómico patológico evidente. (Rodríguez *et al.*, 2008). El patógeno *Ichthyophthirius multifiliis* es el causante de la enfermedad de la mancha blanca (ictiofitiasis). En este trabajo se detectó en el 33,33 % de las muestras controladas y es considerado una contaminación preocupante para los bioterios de pez cebra y acuicultores de todo el mundo debido a que el parásito infecta la piel y las branquias de los peces, que si bien, estos pueden adquirir una respuesta inmune adaptativa protectora contra esta enfermedad, esta bacteria produce proteasas, citotoxinas y enterotoxinas que afectan tanto a los peces como a los humanos. Es un patógeno oportunista que en caso de inmunodepresión puede provocar meningitis, endocarditis y úlceras en la córnea, infecciones en vías intestinales y respiratorias como en heridas ya que la fuente de infección en el humano es el agua. Históricamente, se ha utilizado una variedad de medicamentos y sustancias químicas para combatir la enfermedad, pero debido a las regulaciones cambiantes y al reconocimiento de los efectos cancerígenos y perjudiciales para el medio ambiente, los compuestos más eficientes están prohibidos (Von Gersdorff, 2017). En el caso de *Mycobacterium* spp. se detectaron casos positivos en el 50% de las muestras controladas y es un hallazgo importante debido a que algunas especies son zoonóticas (*Mycobacterium marinum*). Las micobacterias son agentes patógenos comunes del pez cebra (Astrofsky *et al.*, 2000 ; Kent *et al.*, 2004) y se han encontrado en animales infectados sin signos clínicos de enfermedad (Whipps *et al.*, 2012). Se conoce que el estrés exacerba las infecciones por micobacterias en el pez cebra (Ransay *et al.*, 2009) y han mostrado mayor relevancia debido a que estudios recientes de control sanitario, las consideran zoonosis emergentes y el peligro potencial que representan requiere de promover el interés e implementar medidas de bioseguridad para minimizar su diseminación. Existe también la posibilidad de que la infección curse en los peces en forma asintomática donde las bacterias se encapsulan formando focos blanquecinos o grises en riñón, bazo e hígado pero puede desarrollarse posteriormente una reactivación y la aparición de casos agudos de la enfermedad. En las instalaciones de bioterios de producción de peces con sistemas acuáticos cerrados que poseen una alta densidad de animales, se crean condiciones favorables para el desarrollo de este agente infeccioso. Este patógeno es muy resistente a las condiciones ambientales y el manejo inadecuado, la ausencia de controles en la calidad del agua en los acuarios y el aporte nutricional deficiente se considera factores que contribuyen al establecimiento de este patógeno y desarrollo de la enfermedad. El peligro de infección es escaso en condiciones normales pero la implementación de barreras de bioseguridad (monitoreo constante de los parámetros de agua, esterilización de materiales, remoción de detritus, cuarentena,

eliminación de los peces afectados, etc) y prácticas de manejo de acorde a las normativas internacionales es condición necesaria para evitar el ingreso y propagación de este organismo (Laborde & Milocco, 2008). El estrés en la producción de peces de experimentación a menudo está implicado en enfermedades infecciosas en los bioterios y es un estado fisiológico adaptativo y dinámico que ocurre después de que un organismo percibe una amenaza e intenta restablecer el equilibrio fisiológico. El estrés crónico y la elevación del cortisol generalmente son inadaptados, lo que resulta en la supresión inmune y una mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas siendo el cortisol generalmente un indicador de estrés crónico y agudo en los peces. Además, se ha demostrado que el estrés reduce el crecimiento y la aptitud reproductiva de los peces. En condiciones de estrés crónico y elevación de cortisol, la supresión inmune es típica y a menudo contribuye a una mayor prevalencia y morbilidad de las enfermedades en las poblaciones de peces. Se han descrito aumento en el cortisol en peces cebra después del hacinamiento crónico o el estrés de manejo agudo (Mathews, 2004; Ramsay *et al.*, 2009). El impacto en los resultados de una investigación, incluso para las enfermedades más comunes encontradas en instalaciones o bioterios de pez cebra, no se conoce o describe bien. Por ejemplo, es posible especular que *Pseudoloma neurophila*, un patógeno primario que infecta el cerebro, la médula espinal y el músculo del pez cebra, podría afectar los estudios que involucran el desarrollo de fenotipos, pruebas de desarrollo de neurotoxicidad, muerte celular específica del cerebro, investigación conductual y desarrollo musculo esquelético. También se conoce que la micobacteriosis, causa nódulos en varios órganos internos y puede conducir a nefritis granulomatosa, hepatitis que podrían afectar la función renal y hepática, el sistema inmunitario y la expresión de enfermedades en peces genéticamente modificados. Con respecto al control de virus de rutina en roedores de laboratorio, estos métodos generalmente se realizan como ensayos de anticuerpos con antígenos conocidos para delinear la especificidad de la cepa y, por lo tanto, la etiología de la respuesta del anticuerpo viral. Además de la falta de información sobre virus potencialmente importantes en la mayoría de los peces de laboratorio, rara vez se utilizan pruebas serológicas para detectar virus en peces en general. La disponibilidad de ratones libres de patógenos específicos (SPF) es por lo tanto una piedra angular en la investigación y mientras que los salmónidos SPF son accesibles, este concepto se ha adoptado recientemente para el pez cebra. Debido a que muchos patógenos acuáticos u organismos oportunistas colonizan las biopelículas en los filtros biológicos, en acuarios y tuberías, entonces el estado actual del conocimiento sobre las mejores prácticas de cría y los diseños de sistemas es posible deba ser reevaluado para

mantener los peces SPF en sistemas cerrados de recirculación de agua para mantener peces cebras. La confirmación de que un pez es definitivamente SPF se basa en el supuesto de que la prueba de diagnóstico es 100% sensible. Además, como la mayoría de las pruebas de diagnóstico para peces requieren muestras de animales a sacrificar, la designación de una colonia para ser considerada SPF se basa en el número de peces muestreados (Kent *et al.*, 2009).

En este trabajo se encontró que si bien existe una implementación de barreras sanitarias deficientes en la mayoría de los bioterios de peces cebras estudiados, se considera que la falta de un programa de control de salud en las colonias fue lo que facilitó la diseminación y establecimiento de agentes patógenos en las mismas. No fue posible establecer si existe intercambio de peces (sin control sanitario) entre instituciones desde que se comenzó a utilizar esta especie como modelo animal, pero de ser así la diseminación de enfermedades entre los bioterios ira en aumento. En este trabajo también fue posible adecuar metodologías bacteriológicas, moleculares y ópticas con microscopio de campo claro para realizar controles sanitarios en peces cebras. Y en la técnica de PCR desarrollada se concluyó que resulta ser una metodología eficiente en la detección de infecciones por patógenos, como así también se informó por medio de la misma, porcentajes de muestras con resultados positivos de dichos agentes en los bioterios de peces cebras de Argentina.

Hasta el momento, estos controles no se habían implementado en nuestro país para los agentes patógenos en pez cebras, por lo que los conocimientos obtenidos a través de este trabajo otorgan una ventaja para posteriores estudios tanto en el control sanitario de esta especie como en otras de peces que posean infecciones producidas por los mismos patógenos. Como proyección, este estudio deja los cimientos para posteriores investigaciones sobre control sanitario de agentes patógenos que afectan el pez cebras siendo esto fundamental para plantear a futuro soluciones de manejo y control sanitario en bioterios de peces de experimentación como poseer indicadores tempranos de la presencia de infecciones y tratamientos que permitan contener y/o erradicar patógenos de las colonias de peces utilizados en experimentación.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aho R, P. Koski, A. Salonen, and P. Rintamaki . 1988. Fungal swimbladder infection in farmed Baltic salmon (*Salmo salar* L.) caused by *Verticillium lecanii*. Mycoses. 1988 Apr; 31(4):208-12

2. Astrofsky, K.M., C.M. Harper, A.B. Rogers, and J.G. Fox. 2002. Diagnostic techniques for clinical investigation of laboratory zebrafish. *Lab Animal* 31: (3): 41- 45.
3. Astrofsky, K.M., M.D. Schrenzel, R.A. Bullis, R.M. Smolowitz, and J.G. Fox. 2000. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp. Infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities. *Comp. Med.* 50:666-672.
4. Bandi, C. A.M. Dunn, G.D.D. Hurst. and T. Rigaud. 2001. Inherited microorganisms, sex-specific virulence, and reproductive parasitism. *Trends Parasitol.* 17(2): 88-94.
5. Bermúdez, R; Losada. P; Azevedo, A; Guerra-Varela, J; Fernandez, D; Sanchez, L; Padros, F; Nowak, B; Quiroga M. 2018. First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. *Journal of Fish Diseases.* 41(8):1283-1294.
6. Blaylock, R.B., R.M. Overstreet, and M.A., Klich. 2001. Mycoses in red snapper (*Lutjanus campechanus*) caused by two deuteromycete fungi (*Penicillium corylophilum* and *Cladosporium sphaerospermum*) *Hydrobiologia.* 460: 221-228.
7. Boos, S., H. Schmidt, G. Ritter, *et al.* 1995. Effectiveness of oral rifampicin against mycobacteriosis in tropical fish. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 108:253-255. (in German).
8. Bowater, R.O., A. Thomas, R.G. Shivas, and J.D. Humphrey. 2003. Deuteromycotic fungi infecting barramundi cod, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes), from Australia. *J. Fish Dis.* 26: 681-686.
9. Bowker, J, and D. Erdahl. 1998. Observations on the efficacy of chloramine-T treatment to control mortality in a variety of salmonids. *Prog. Fish Cult.* 60:63-66.
10. Bruno, D.W. 1989. Observations on a swim bladder fungal infection of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Bull. Eurp. Asso. Fish Pathol.* 9:7-8.
11. Collymore C., Crimm J., Lieggi G. Recommendations for Health Monitoringn and Reporting for Zebrafish Research Facilities. Volume 13, Supplement 1, 2016.

12. Colorni, A., M. Ankaoua, A. Diamant, and W. Knibb. 1994. Detection of mycobacteriosis in fish using the polymerase chain reaction technique. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 6:195-198.
13. Conroy, G., and D. Conroy, 1999. Acid-fast bacterial infection and its control in guppies (*Lesbistes reticulatus*) reared on an ornamental fish farm in Venezuela. Vet. Rec. 13:177-178.
14. De Kinkelin, P. D. 1980. Occurrence of a microsporidian infection in zebra danio *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). J. Fish Dis., 3:71-73.
15. Dietrich, H. W., Westerfield, M., and Zon, L. T. (1999a). The zebrafish: Biology. In "Methods in Cell Biology" (L. Wolson and P. Matsudaira, ed.), Vol. 59. Academic Press, San Diego.
16. Dietrich, H. W., Westerfield, M., and Zon, L. T. (1999b). The zebrafish: Genetics and genomics. In "Methods in Cell Biology" (L. Wolson and P. Matsudaira, ed.), Vol. 59. Academic Press, San Diego.
17. Dickerson, H.W. and D.L. Dawe. 1995. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans*. In P.T.K. Woo (ed.) Fish Diseases and Disorders Vol. 1. Protozoan and Metazoan Infections. pp. 181-228. CAB Intl. Publ., Wallingford, Oxon, England.
18. Driever, W., Stemple, D., Schier, A., and Solnica-Krezel, L. (1994). Zebrafish: Genetic tools for studying vertebrate development. Trends Genet. 10, 152-159.
19. Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. E, Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkuis, E, Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., and Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. Development 123, 37-46.
20. Dunn, A.M., R.S. Terry, and J.E. Smith. 2001. Transovarial transmission in the microsporidia. Adv. Parasitol: 48: 57-100.

21. Ferguson, J., V. Watral, A. Schwindt, and M.L. Kent. 2007. Spores of two fish Microsporidia (*Pseudoloma neurophilia* and *Glugea anomola*) are highly resistant to chlorine. Dis. Aquat. Org. 76: 205-214.
22. Hallett, S.L., S.D. Atkinson, C. Ersus, and M. El-Matbouli, M. 2005 Dissemination of triactinomyxons (Myxozoa) via oligochaetes used as live food for aquarium fishes Dis. Aquat. Org. 65: 137-152.
23. Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane D. A., Odenthal, J., van Eeden, E J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., and Nusslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. Development 123, 1-36.
24. Hammer Hugh S. The Zebrafish in Biomedical Research, Chapter 29 - Water Quality For Zebrafish Culture, Editor(s): Samuel C. Cartner, Judith S. Eisen, Susan C. Farmer, Karen J. Guillemin, Michael L. Kent, George E. Sanders, In American College of Laboratory Animal Medicine, Academic Press, 2020, Pages 321-335, ISBN 9780128124314, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00029-4>.
25. Hawke, J.P., McWhorter, A.C., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. Intl. J. Syst. Bacteriol. 31: 396-400.
26. Heckman, R. 1985. Ivermectin efficacy trials for nematodes parasitic in fish. Am. Fish. Soc./Fish Health Sec. Newslett. 13(1):6.
27. Hedrick, R.P., J.M. Groff, and D.V. Baxa. 1991. Experimental infections with *Enterocytozoon salmonis* Chilmonczyk, Cox, Hedrick (Microsporea): an intranuclear microsporidium from chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 10: 103-108.
28. Hoffman, G.L. 1982. *Capillaria catostomi*, a new pathogenic nematode of golden shiners and other fishes. Proc. Catfish Farmers Am. Res. Workshop. 49-50.

29. Høyen, H.A., S.H. Lacey, and T.J. Graham. 1998. Atypical hand infections. *Hand Clin.* 4:613-634.
30. Jagadeeswaran, P., and Liu, Y. C. (1997). A hemophilia model in zebrafish: Analysis of hemostasis. *Blood Cells Mol. Dis.* 23, 52-57.
31. Johnson, S.C., M.L. Kent, D.J. Whitaker, and L. Margolis. 1993. Toxicity and pathological effects of orally administered ivermectin in Atlantic, chinook, and coho salmon and steelhead trout. *Dis. Aquat. Org.* 17:107-112.
32. Kahn, P. (1994). Zebrafish hit the big time. *Science* 264, 904-905.
33. Kano, T., and H. Fukui. 1982. Studies on *Pleistophora* infection in eel, *Anguilla japonica* - I. Experimental induction of microsporidiosis and fumagillin efficacy. *Fish Pathol.* 16(4): 193-200.
34. Kent, M.L., and S.C. Dawe. 1994. Efficacy of Fumagillin DCH against experimentally-induced *Loma salmonae* (Microsporea) infections in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.* 20: 231-233.
35. Kent, M.L., L. Margolis, and J.O. Corliss. 1994. The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum Myxozoa Grassé, 1970. *Can. J. Zool.* 72:932-937
36. Kent, M.L., and T.T. Poppe. 1998. Diseases of seawater netpen-reared salmonids. Pacific Biological Station Press, Nanaimo, British Columbia, Canada. 138 pp.
37. Kent, M.L., K.B. Andree, J.L. Bartholomew, M. El-Matbouli, S.S. Dessler, R.H. Devlin, R.P. Hedrick, R.W. Hoffmann, J. Khattra, S.L. Hallett, R.J.G. Lester, O. Palenzeula, M.E. Siddall, and C. Xiao. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Euk. Microbiol.* 48:395-413.
38. Kent, M.L., J. K. Bishop-Stewart, J. L. Matthews, and J.M. Spitsbergen. 2002. *Pseudocapillaria tomentosa*, a nematode pathogen of zebrafish (*Danio rerio*) kept research colonies and associated neoplasms. *Comp. Med.* 52; 362-367.

39. Kent, M.L., J.L. Matthews, J. K. Bishop-Stewart, C. M. Whipps, V. Watral, M. Poort, L. Bermudez. 2004. Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities. Comp. Biochem. Physiol -Part C (Toxicol. Pharmacol.). 138: 383-390.
40. Kent, M.L., V. Watral , M. Wu , L. Bermudez. 2006. In vivo and in vitro growth of *Mycobacterium marinum* at homoeothermic temperatures. FEMS Microbiol. Lett. 257: 69-75.
41. Kent, M.L., S.W. Feist. C. Harper, S. Hoogstraten-Miller, J.M. Law, J.M. Sanchez-Morgado, R.L. Tanguay, G.E. Sanders, J.M. Spitsbergen, and C.M. Whipps. 2009. Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. Comp. Biochem. Physiol Part C (Toxicol. Pharmacol.) 149: 240-248.
42. Kent, M.L., Heidel, J.R., Watral, V.G., Bishop-Stewart, J.K., Matthews, J.L., Ostland, V. 2006a. Some decalcification procedures inhibit acid fast staining of *Mycobacterium* spp. in tissue sections. Am. Fish Am. Fish. Soc./Fish Health Sect. Newslett. (in press).
43. Kent, M.L., and J.L. Bishop-Stewart. 2003. Transmission and tissue distribution of *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) of zebrafish *Danio rerio*. J. Fish Dis. 26:1-4.
44. Kent, M.L., Lyons, J.M. 1982. *Edwardsiella ictaluri* in the green knifefish, *Eigemannia virescens*. Fish Health News 11(2):2.
45. Kern, W., E. Vanek, and H. Jungbluth. 1989. Fish breeder granuloma: infection caused by *Mycobacterium marinum* and other atypical mycobacteria in the human. Analysis of 8 cases and review of the literature. Med. Klin. 84:578-583.
46. Kilmartin, J. D. Cazabon, and P. Smith. 1996. Investigations of the toxicity of ivermectin for salmonids Bull. Eurp. Ass. Fish Pathol. 17(2): 58-61.
47. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ulman, B., and Schilling, T. E (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203, 253-310.

48. Laborde J, Milocco S. Temas de zoonosis IV. Zoonosis en peces de experimentación. 1º Edición. junio 2008. ISBN: 987-97038-3-0. 49:439-445.
49. Lehmann, J., D. Mock, W. and W. Schafer. 1999. Swim bladder infection of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by a fungus: a case report. Bull. Eurp. Asso. Fish Pathol 19:83-84.
50. Lessing. M.P. and M.M. Walker. 1993. Fatal pulmonary infection due to *Mycobacterium fortuitum*. J. Clin. Pathol. 46:271-272.
51. Lom, J. and I. Dyková. 1992. Protozoan parasites of fishes. Elsevier Press.
52. Lomankin, V.V., and V.Ya. Trofimenko. 1982. Capillarids (Nematoda: Capillariidae) of freshwater fish fauna of the USSR. Tr. Gelan 31:60-87.
53. Lumsden, J.S., V.E. Ostland, and H.W. Ferguson. 1998. Toxicity of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout. J. Aquat. Animal Health 10:230-241.
54. Maierdiyali A, Wang L, Luo Y, Li Z. Effect of Tank Size on Zebrafish Behavior and Physiology. Animals (Basel). 2020 Dec 9;10(12):2353. doi: 10.3390/ani10122353. PMID: 33317187; PMCID: PMC7763847.
55. Matthews, J.L., A.M.V. Brown, K. Larison, J.K. Bishop-Stewart, J.K., P. Rogers, and M.L. Kent. 2001. *Pseudoloma neurophilia* n.g., n.sp., a new genus and species of Microsporidia from the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). J. Euk. Microbiol. 48:229-235.
56. Miyazakai, T. S.S. Kubota, and T. Miyashita. 1984. A Histopathological study of *Pseudomonas fluorescens* infection in tilapia. Fish Pathol. 19: 161-166.
57. Moore, J.L., M. Aros, K.G. Streudel, K.C. Cheng. 2001. Fixation and decalcification of adult zebrafish for histological, immunocytochemical, and genotypic analysis. BioTechniques 32: 296-298.

58. Moravec, F. 1987. Revision of capillariid nematodes (subfamily Capillariinae) parasitic in fishes. Academia natkadelství Československé akademie ved, Praha.
59. Moravec, F., J. Prokopic, and A.V. Shlikas. 1987a. The biology of nematodes of the family Capillariidae Neveu-LeMaire, 1936. *Folia Parasitol.* 34:39-56.
60. Moravec, F., M. Gelnar, and J. Øehulaka. 1987b. *Capillostrongylodes ancistri* sp. n. (Nematoda: Capillariidae) a new pathogenic parasite of aquarium fishes in Europe. *Folia Parasitol.* 34:157-161.
61. Murray, K.N., Bauer, J., Tallen, A., Matthews, J.L., Westerfield, M., and Varga, Z.M. (2011) Characterization and management of asymptomatic mycobacterium infections at the zebrafish international resource center. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS.* 50(5):675-679.
62. Noga, E. 1996. Fish disease: diagnosis and treatment. Mosby Electronic Publishing. St. Louis.
63. Noga, E. 2010. Fish disease: diagnosis and treatment. Mosby Electronic Publishing. St. Louis.
64. Nusbaum, K.E., Morrison, E.E. 2002. *Edwardsiella ictaluri* bacteraemia elicits shedding of *Aeromonas hydrophila* complex in latently infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 25: 343-350.
65. Pack, M., J. Belak, C. Boggs, M. Fishman, and W. Driever. 1995. Intestinal capillariasis in zebrafish. *Zebrafish Sci. Mont.* 3(4):1-3.
66. Parikka M, Hammaren MM, Harjula SK, Halfpenny NJ, Oksanen KE, Lahtinen MJ, Pajula ET, Iivanainen A, Pesu M, Ramet M 2012. *Mycobacterium marinum* causes a latent infection that can be reactivated by γ irradiation in adult zebrafish. *PLoS Pathog* 8: e1002944.
67. Pettijon LL, Routine Fish Disease Monitoring. 1977. U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Service Leetown, WV.

68. Petrie-Hanson, L., Romano, C.L., Mackey, R.B., Khosravi, P., Hohn, C.M., Boyle, C.R. 2007. Evaluation of zebrafish *Danio rerio* as a model for enteric septicemia of catfish (ESC). J. Aquat. Animal Health 19: 151-158. 3(4):1-3.
69. Phelps, N.B.D. and A.W. Goodwin. 2008. Vertical transmission of *Ovipleistophora ovariae* (Microspora) within the eggs of the golden shiner J. Aquat.c Animal Health 20:45-53.
70. Plumb, J. 1999. *Edwardsiella septicaemias*. In: P.T.K. Woo and D.W. Bruno (eds.). *Fish Diseases and Disorder*, Vol. 3 pp. 479-522. CAB Intl. Publ., Wallington, Oxon, UK.
71. Poort, M.J., Whipps, C.M., Watral, V.G. Font, W.F., Kent, M.L. 2006. Molecular characterization of a *Mycobacterium* species in non-native poeciliids in Hawaii using DNA sequences. J. Fish Dis. 29:181-185.
72. Postlethwait, J. H., and Talbot, J. (1997). Zebrafish genomics: From mutants to genes.
73. Ramsay, J.M., Watral, V., Schreck, C.B., Kent, M.L. 2009. *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) infections in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of stress on survival, growth and reproduction. Dis. Aquat. Org. (in press).
74. Raymond W. M. Kwong, Yusuke Kumai, Steve F. Perry. The physiology of fish at low pH: the zebrafish as a model system. Comparative physiology – A tribute to Chris Wood 01 march 2014.
75. Richenbach-Klinke, H.H. 1952. Beobachtungen an fischpathogenen Arten der Nematodengattung *Capillaria* Zeder. Die Aquarien und Terrarien-zeitschr., Datz 5:68-70.
76. Rodríguez, Novoa, Figueras. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology (2008) 25, 239e249.

77. Rubinstein AL. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2003;6:218–223.
78. Shaw, R.W., and M.L. Kent. 1999. Fish Microsporidia. In: M. Wittner and L.M. Weiss (eds.). *Microsporidia and Microsporidiosis*. Am. Soc. Microbiol. Press pp. 418–446.
79. Shaw, R.W., M.L. Kent, and M.L. Adamson. 1999. Iodophor treatment is not completely efficacious in preventing *Loma salmonae* (Microsporidia) transmission in experimentally challenged chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 22:1-3.
80. Shih, J.Y., P. R. Hsueh, Y.L. Chang, *et al.* 1997. Osteomyelitis and tenosynovitis due to *Mycobacterium marinum* in a fish dealer. *J. Formos. Med. Assoc.* 96:913-916.
81. Siddall, M.E., D.S. Martin, D. Bridge, S.S. Desser, D.K. Cone. 1995. The demise of a phylum of protists: phylogeny of the Myxozoa and other parasitic cnidaria. *J. Parasitol.* 81:961-967.
82. Toovey, J.P.G., A.R. Lyndon, and J.H. Duffus. 1999. Ivermectin inhibits respiration in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) gill tissue. *Bull. Eurp. Ass. Fish Pathol.* 19: 149-152.
83. Varga, Z.M., Murray, K.N. (2016) Health monitoring and disease prevention at the Zebrafish International Resource Center. *Methods in cell biology.* 135:535-51.
84. Loise Von Gersdoff Jorgensen, 2017. The fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* – Host immunology, vaccines and novel treatments. *Fish & Shellfish Immunology* 67: 586-59.
85. Wada S, K. Hatai, E. Tanaka, and T. Kitahara. 1993. Mixed infection of an acid-fast bacterium and an imperfect fungus in a Napoleon fish (*Cheilinus undulatus*). *J Wildl Dis.* 29:591-595.
86. Waltman, W.D., Shotts, E.B., Blazer, V.S. 1985. Recovery of *Edwardsiella ictaluri* from danio (*Danio devario*). *Aquaculture* 46: 63-66.

87. Waltman, W.D., Shotts, E.B., Hsu, T.C. 1986. Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. Appl. Environ. Microbiol. 51: 101-104.
88. Weaver CJ, Leung YF, Suter DM. 2016. Expression dynamics of NADPH oxidases during early zebrafish development. J Comp Neurol 524:2130 – 2141. CrossRef Medline
89. Weinstein, B.M., Stempel, D.L., Driever, W., & Fishman, M.C. (1995). Gridlock, A localized, heritable defect of vascular patterning in zebrafish. Nat. Medicine. 1, 1143-1147.
90. Whipps C.M., and M.L. Kent. 2006. Polymerase chain reaction detection of *Pseudoloma neurophilia*, a common microsporidian of zebrafish (*Danio rerio*) reared in research laboratories. Contemp. Top. Lab. Anim. Sci 45: 13-16.
91. Whipps CM, Lieggi C, Wagner R. Mycobacteriosis in zebrafish colonies . ILAR J 2012; 53 : 95-105.
92. Whipps CM, Moss LG, Sisk DM, Murray KN, Tobin DM, Moss JB. Detection of autofluorescent *Mycobacterim chelonae* in living zebrafish. Zebrafish 2014; 11:76–82.
93. Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). J Am Assoc Lab Anim Sci. 2009 Nov;48(6):785-9. PMID: 19930828; PMCID: PMC2786934.
94. Williams, and H.A. Jones. 1994. Parasitic worms of fish. Taylor and Francis, London. 593.
95. Zala SM. <http://www.sci-news.com/biology/article00415.html>.
96. Zrzavy J, and V Hypša. 2003. Myxozoa, *Polypodium*, and the origin of the Bilateria: The phylogenetic position of “Endocnidozoa” in light of the rediscovery of *Buddenbrockia*. Cladistics 19:164-169.

Publisher: Eliva Press Global Ltd

Email: info@elivapress.com

e-version

All rights reserved.

Eliva Press is an independent international publishing house established for the publication and dissemination of academic works worldwide. The company provides high quality and professional service to all our authors.

Our Services:

Free of charge, open-minded, eco-friendly, innovational.

-Free standard publishing services (manuscript review, step-by-step book preparation, publication, distribution, and marketing).

-No financial risk. The author does not have to pay any hidden fees for publication.

-Editors. Dedicated editors will assist step by step through the projects.

-Money paid to the author for every book sold. Up to 50% royalties guaranteed.

-ISBN (International Standard Book Number). We assign a unique ISBN to every Eliva Press book.

-Digital archive storage. Books will be available online for a long time. We don't need to have a stock of our titles. No unsold copies. Eliva Press uses environment friendly print on demand technology that limits the needs of publishing business. We care about environment and share these principles with our customers.

-Cover design. Cover art is designed by a professional designer.

-Worldwide distribution. We continue expanding our distribution channels to make sure that all readers have access to our books.

-Marketing tools. We provide marketing tools such as banners, paid advertising, social media promotion and more.

www.elivapress.com