



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Patología Animal

Micosis Sistémica asociada a *Exophiala salmonis* en Turbot
(*Scophthalmus maximus*) cultivados en Chile

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Grado de LICENCIADO EN
MEDICINA VETERINARIA.

Marcos Gilbert Godoy Gatica
Valdivia Chile 1999

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enriquez S.

Nombre

Firma

PROFESOR COPATROCINANTE

Dr. Enrique Paredes H.

Nombre

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Dr. Eduardo Valenzuela

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Gerold Sievers P.

Nombre

Firma

Dr. Frederick Ahumada

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACION 20 de Enero de 2000

INDICE

1.- RESUMEN	1
2.- SUMMARY	2
3.- INTRODUCCIÓN	3
4.- MATERIAL Y MÉTODO	6
4.1.- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	6
4.2.- ANTECEDENTES	6
4.3.- ESTUDIO MACROSCÓPICO EXTERNO	6
4.4.- EXAMEN DE FROTIS FRESCO	7
4.5.- EXAMEN EN FRESCO DE BRANQUIA	7
4.6.- NECROPSIA Y EXAMEN MACROSCÓPICO INTERNO	7
4.7.- BACTERIOLOGÍA	7
4.8.- MICOLOGÍA	8
4.9.- HISTOPATOLOGÍA	8
5.- RESULTADOS	9
5.1.- ANTECEDENTES	9
5.2.- HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EXTERNOS	10
5.3.- EXAMEN DE FROTIS FRESCO DE PIEL, BRANQUIAS, LESIONES Y EXAMEN EN FRESCO DE BRANQUIAS	10
5.4.- HALLAZGOS MACROSCÓPICOS INTERNOS	10
5.5.- BACTERIOLOGÍA	11
5.6.- HISTOPATOLOGÍA	11
5.7.- MICOLOGÍA	12
6.- DISCUSIÓN	19
7.- BIBLIOGRAFÍA	23
8.- ANEXOS	25

1.- RESUMEN

"MICOSIS SISTEMICA ASOCIADA A *Exophiala salmonis* EN TURBOT (*Scophthalmus maximus*), CULTIVADOS EN CHILE"

La presente investigación describe una micosis sistémica, asociada a *Exophiala salmonis*, que afecta a turbot (*Scophthalmus maximus*) cultivados en Chile. El cuadro se caracteriza por la presencia nódulos individuales o múltiples de color rosado a rojo que se proyectan desde la superficie de la piel. El tamaño de los nódulos varía entre 0,4 cm a 1,5 cm de diámetro y de consistencia blanda. Internamente se presenta el riñón y bazo inflamado. Histopatológicamente las secciones de musculatura a nivel de las nodulaciones presentan una severa reacción inflamatoria con presencia de macrófagos y fibroblastos con formación de múltiples granulomas que encierran focos de tejido necrótico. En el riñón y bazo, la reacción corresponde a la formación de granulomas con una zona de necrosis central. Con la tinción Grocott y PAS se pudo visualizar cantidades variables de hifas. En todas las siembras realizadas con material provenientes de las lesiones externas se obtuvo crecimiento fúngico en Agar Sabouraud 2 % glucosa, Agar extracto de malta y Agar patata glucosa después de 21 días de incubación. Las colonias miden aproximadamente de 2 a 16 mm, la superficie es aterciopelada, de color verde a gris y el reverso negro; el micelio presenta hifas septadas, hialinas y no se observan estructuras de reproducción sexual. Las conidias no poseen base truncada, posee un hilum distintivo, poseen forma subglobosa a elipsoidal y se originan en sucesión a partir de una célula conidiogénica; la célula conidiogénica es subglobosa y la estructura de soporte es hialina. Con los antecedentes mencionados se pudo establecer que el hongo en estudio corresponde a la especie *Exophiala salmonis*. Se establece una fuerte asociación entre la presencia de hifas en las lesiones externas (frotis fresco y cultivos) y las lesiones histológicas, por lo tanto, y conforme a los estudios micológicos efectuados, se postula que el organismo causal es *Exophiala salmonis*. Se discuten las posibles vías de ingreso del patógeno al pez y los mecanismos de diseminación en los órganos.

Palabras claves: Turbot, *Exophiala*, Micosis, Ictiopatología

2.- SUMMARY

"SYSTEMIC MYCOSIS ASSOCIATED WITH *Exophiala salmonis* IN TURBOT (*Scophthalmus maximus*), GROWN IN CHILE"

This research describes a systemic mycosis related to *Exophialia salmonis* that affects turbot (*Scophthalmus maximus*) grown in Chile. The condition is characterized by the presence of individual or multiple nodules that rise from the skin's surface, which is pink to red in color, are from 0.4 cm to 1.5 cm in size and are soft. Internally they appear on the kidney and inflamed spleen. Histopathologically the muscle sections at the level of the nodulations are severely inflamed with the presence of macrophags and fibroblasts with the formation of multiple granulomas enclosing centers of necrotic tissue. The reaction in the kidney and spleen includes the formation of granulomas with a central necrosis zone. Variable amounts of hyphas were defined using Grocott dye and PAS. In all of the cultures taken from the external lesions, growth was obtained in 2% glucose Agar Sabouraud, malt extract Agar and glucose fungus potato Agar after 21 days of incubation; the colonies measure approximately 2 to 16 mm, the surface is velvety, green to gray in color and the other side of the plate is black; the mycelium has septed hyphas, is hyaline and there is no sexual reproduction; the conidiums are not truncated, have a distinctive hilum, are subgloboid to elipsoidal in shape, are septed and occur successively from a codineogenic cell; the codineogenic cell is subgloboid and the supporting structure is hyaline. This information shows that the colony belongs to the *species Exophiala salmonis*. There is a strong association between the presence of hyphas in the outer lesions (fresh facade and cultures) and in the histopathological lesions and, therefore, the causal agent is *Exophiala salmonis*. The possible ways that the pathogen could have entered the fish are discussed together with the mechanisms for its dissemination in the organs.

Keywords: Turbot, Exophiala, Mycosis, Ictyopathology

3.- INTRODUCCION

El desempeño del sector acuícola Chileno, ha mostrado un vigoroso crecimiento en la última década. El aumento de la producción experimentado por esta actividad en los últimos diez años alcanza un crecimiento de 2.4 %, al pasar de US\$ 3,2 millones exportados en 1987 a cerca de US\$ 740 millones exportados en 1997, cifra que debería alcanzar los US\$ 850 millones en 1998 (Compendio de la Acuicultura de Chile, 1999).

Como ha sido tradicional en este último decenio, la acuicultura chilena se ha sustentado principalmente en el volumen de las cosechas de especies salmonídeas y de algas. Pero el cultivo de salmonídeos, si bien es y seguirá siendo la actividad más importante en el sector de la acuicultura nacional, no es la única que puede dar frutos, pues existen otras especies cuyos cultivos muestran interesantes crecimientos, como lo es el caso de algunos bivalvos y nuevas especies exóticas como el turbot (*Scophthalmus maximus*), abalón (*Haliotis rufescens*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), hirame (*Paralichthys olivaceus*) y channel catfish (*Ictalurus punctatus*).

El turbot (*S. maximus*) es una especie de gran valor comercial cuyas capturas en ambientes naturales se encuentran en franco descenso. Su tecnología de cultivo fue introducida al país a partir de estudios iniciados por Fundación Chile el año 1989. Actualmente existen iniciativas comerciales en Tongoy, IV Región y en las localidades de Las Cruces y Los Molles, en la V Región. La producción nacional de turbot se ha incrementado de 3 toneladas en 1991 a 278 toneladas en 1997, con una producción esperada de 300 toneladas para 1998 (Compendio de la Acuicultura de Chile, 1999).

El desarrollo de la acuicultura ha hecho percibir la gran importancia de las enfermedades en las especies cultivadas. Esta importancia es más relevante si se trata de enfermedades infecciosas y actualmente se puede afirmar que las enfermedades pueden llegar a limitar el potencial productivo y rentabilidad comercial de las empresas acuícolas.

El desarrollo que ha experimentado el cultivo del turbot (*S. maximus*) a nivel mundial, ha traído consigo un incremento de los problemas sanitarios. Entre las principales enfermedades diagnosticadas a nivel global se encuentran infecciones

bacterianas por *Vibrio sp.*, *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Flexibacter marítimas*. En relación a los agentes virales se ha detectado el Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), Virus de la necrosis nerviosa viral (VNN), Turbot Rotavirus (TRV), Virus de la Septicemia hemorrágica viral (VHSV), Paramixovirus-like y Herpesvirus scophthalmi. Las enfermedades parasitarias más comunes son causadas por los ciliados *Trichodina sp.*, *Criptocaryon*, el flagelado *Ichthyobodo* (Costia) y el microsporidium *Tetramicra brevifilum* (Novoa y col. 1992; Soutar, 1993; Toranzo y col., 1993; Fernández, 1996; Castric, 1997). Esta situación hace necesario destinar esfuerzos en conocer las enfermedades que afectan a los cultivos de Turbot (*S. maximus*) en nuestro país, con el fin de formar una base científica que permita elaborar estrategias de control, antes que estas puedan llegar a limitar la producción; esto es más relevante si se trata de estudiar las patologías en especies introducidas en el país.

Entre las enfermedades infecciosas que afectan a peces teleósteos se ha descrito una variedad de especies de hongos asociados a patologías, aunque en muchas ocasiones no existe evidencia de su rol como patógenos primarios (Roberts, 1978). Entre las principales micosis descritas en peces teleósteos se encuentra la Saprolegniosis causada por una serie de grupos de hongos acuáticos que pertenecen a los géneros *Saprolegnia*, *Achyla*, *Aphanomyces* y *Leptolegnia*. Afectan a ovas y peces de todos los estados de desarrollo, presentándose en ambientes de agua dulce y aguas estuarinas. Además se reporta la Branchiomycosis, causada por las especies *Branchiomyces sanguinis* y *Branchiomyces demigrans*, que se caracteriza por la necrosis de las branquias debido al crecimiento intravascular de las hifas, ocasionando estrés respiratorio. Por último, Ichthyophonosis cuya etiología es atribuida a *Ichthyophonus hoferi*, el cual es capaz de infectar a una serie de peces en ambientes de agua dulce y agua de mar, cuyo cuadro se caracteriza clínicamente por emaciación, presencia de úlceras redondeadas en la piel, escoliosis y presencia de granulomas en la piel y órganos viscerales los cuales contienen esporas enquistadas (Roberts, 1978; Stoskopf, 1992; Brown, 1993).

Otro tipo de infecciones causadas por hongos de menor incidencia en los cultivos, son aquellas ocasionadas por especies pertenecientes al género *Exophiala*, las cuales han sido reportadas como causa de micosis sistémicas en numerosas especies de peces. Carmichael (1966), describe una condición invasiva en el cerebro en trucha cut-throat (*Salmo clarki*) y trucha de lago (*Salvelinus namaycush*), causada por un hongo Phialophora-like el cual es nombrado como un nuevo género y especie, *Exophiala salmonis*. Fijan (1969), reporta una micosis sistémica en channel catfish (*Ictalurus punctatus*), y reproduce experimentalmente la infección en esta especie, catfish blanco (*Ictalurus catus*) y pez de branquias azules (*Lepomis macrochirus*). Posteriormente, McGinnis y Ajello (1974), caracterizan al hongo y lo denominan

Exophiala pisciphilus. Richards y col. (1978) y Otis y col. (1985) detallan una infección en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), cuya etiología es un hongo que denominan *Exophiala salmonis* y Langvad y col. (1985) aíslan de smolt y postsmolt de salmón del Atlántico (*S. salar*) una especie no descrita de *Exophiala*. Blazer y Wolke (1979), describen una micosis sistémica causada por un *Exophiala-like* que se presenta naturalmente en cinco géneros de peces en un acuario público (*Stentotomus vesicolor*, *Gadus morhua*, *Hippocampus hudsonius*, *Xanthichthys ringens* y *Amphiprion sebae*) y reproduce experimentalmente la infección en tres especies adicionales (*Tauogolabrus adpersus*, *Pseudopleuronectes americanus* y *Fundulus heteroclitus*).

El presente trabajo tiene como objetivo la descripción macroscópica y microscópica del primer registro *Exophiala salmonis* asociada a una micosis sistémica que afecta al pez plano Turbot (*S. maximus*) cultivado en Chile. Además se exponen antecedentes respecto del aislamiento y descripción del agente causal.

4.- MATERIAL Y METODO

4.1.- RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Durante un período de doce meses se realizaron muestreos dirigidos en estanques pertenecientes al Centro de engorda de turbot (*Scophthalmus maximus*) de la Empresa Granjamar S.A., ubicada en la localidad de Tongoy, IV Región, tendientes a identificar peces con lesiones en la superficie de la piel.

Un total de 14 peces con lesiones externas fueron identificados y analizados en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile y/o en el Laboratorio de la empresa Granjamar S.A.

4.2.- ANTECEDENTES

Se describió un historial completo de las muestras, especificando el método de cultivo, densidad, alimentación, mortalidad, factor de conversión, condiciones ambientales, fecha de muestreo, lote de procedencia de los peces, historia de enfermedades y tratamientos previos.

De cada pez se registró el peso y longitud individual con el objeto de determinar el promedio de peso y longitud de los peces muestreados.

4.3.- ESTUDIO MACROSCÓPICO EXTERNO

Se realizó una descripción de los hallazgos registrados durante el examen general que consideró, el estado de la piel, aletas, ojos, boca, branquias, opérculo y ano.

4.4.- EXAMEN DE FROTIS FRESCO

Se realizó un raspado de mucus de piel, branquias y lesiones utilizando un portaobjeto en dirección cráneo-caudal. Luego se deposita y se extiende bien el material sobre un portaobjeto se agrega unas gotas de agua de mar y se cubre con un cubreobjeto. Se observó al microscopio con el condensador bastante cerrado. Adicionalmente, se procede a examinar un raspado de las lesiones superficiales que presenten los peces. Después de ser examinados los frotis se proceden a secar a temperatura ambiente y posteriormente fueron teñidos con la tinción Gram para ser examinados al microscopio con un mínimo de 25 campos, a un aumento entre 900 a 1000x.

4.5. - EXAMEN EN FRESCO DE BRANQUIAS

Se procedió a cortar el opérculo, para posteriormente seccionar uno de los arcos branquiales del cual se separan los filamentos del eje del arco hasta que se individualicen los distintos filamentos, se disponen sobre un portaobjeto (de tal forma que no queden uno sobre otro) se agrega una gota de agua de mar, se cubre con un cubreobjeto y se observa al microscopio.

4.6.- NECROPSIA Y EXAMEN MACROSCÓPICO INTERNO

Se procedió a cortar la aleta lateral, para posteriormente realizar una incisión en la región del ano, se levanta con una pinza la piel de la masa visceral y se continuó por el contorno de la cavidad abdominal. Se realiza una descripción detallada del aspecto general de los órganos internos.

4.7.- BACTERIOLOGÍA

Las muestras para este tipo de análisis se colectan asépticamente, utilizando un asa de platino al rojo, las cuales son inoculadas en placas por el método de estrías sobre el medio de cultivo correspondiente. Los tejidos de los cuales se toman muestras son branquias, hígado, bazo, riñón y las lesiones superficiales de la piel.

Con el objeto de determinar agentes bacterianos las branquias fueron inoculadas en medios de cultivo Agar soya tripticasa (BBL, Art. No. 11768) con la incorporación de 2% de NaCl, y en Agar Anacker y Ordal modificado (Toranzo y

Barja, 1993). Las lesiones externas y los órganos internos (riñón e hígado) fueron inoculados en Agar tiosulfato citrato con sales biliares sacarosa (Merk, Art. No. 10263) y Agar soya tripticasa (BBL, Art. No. 11768) con la incorporación de 2 % de NaCl.

La incubación se realiza utilizando una estufa de cultivo microbiológico a una temperatura de cultivo entre 18 °C a 20 °C durante 5 días, después de los cuales se realizan subcultivos de las colonias sospechosas en Agar soya tripticasa para realizar su posterior identificación utilizando sistemas disponibles comercialmente tales como API ZIM y API 20 E (Laboratorio BioMérieux).

4.8.- MICOLOGÍA

Con el objeto de determinar la presencia de hongos, se toman muestras de riñón, hígado y lesiones externas, las cuales son maceradas en suero fisiológico e inoculadas en Agar Sabouraud 2 % glucosa (Merk, Art. No. 5438), Agar extracto de malta (Merk, Art. No. 5398), y Agar patata glucosa (Merk, Art. No. 10130). Las placas son incubadas entre 15 y 18 ° C durante 21 días, después de lo cual se seleccionan colonias individuales para su identificación. La identificación de los hallazgos micológicos se realizó en el Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, utilizando la metodología descrita por De Hoog (1977).

4.9.- HISTOPATOLOGÍA

Se tomaron muestras de órganos internos (hígado, riñón, bazo y cerebro) y de las lesiones externas de 9 peces, siendo fijadas en una solución de formalina al 10 % tamponada con un trozo de carbonato de calcio. De esta forma fueron trasladadas al Laboratorio de Anatomía Patológica perteneciente al Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, donde fueron procesadas en autotécnico a fin de ser deshidratadas e impregnadas en parafina sólida, para posteriormente ser cortadas mediante micrótopo a 5-6 micras y teñidas con Hematoxilina & Eosina y Grocott (Luna, 1968), así como con Periodic Acid Schiff, PAS,(Ganter y Jollés, 1970). Con el propósito de caracterizar histológicamente las alteraciones encontradas, los cortes obtenidos se observaron con un microscopio óptico marca Zeiss.

5.- RESULTADOS

5.1.- ANTECEDENTES

Europa los cuales son inducidos a desovar mediante el control del fotoperiodo y termoperiodo. La producción de juveniles se realiza en ambiente controlado o hatchery que cuenta con áreas de cultivo larval y salas de post larvas y juveniles hasta alcanzar un peso de 2 a 5 g alrededor de los 80 días de edad. Posteriormente los peces son trasladados a la preengorda a estanques circulares tipo Australianos de 4 metros de diámetro y una columna de agua de 50 cm en los cuales son mantenidos durante 4 meses hasta alcanzar un peso de 200 g, después de lo cual se traslada a la engorda en estanques circulares tipo Australianos de 7.4 m de diámetro y 80 cm de columna de agua donde son mantenidos aproximadamente durante 20 meses hasta su peso de cosecha de 1.5 a 2 kilos de peso.

Las densidades de cultivo fluctúan entre 20 a 40 kg/m², la alimentación consiste en pellet de un calibre que fluctúa entre 3.5 mm a 16 mm dependiendo de la talla de los peces a alimentar. La mortalidad acumulada considerada como normal durante el período de engorda es de un 1 % mensual y el factor de conversión del período de engorda fluctúa entre 1.0 a 1.5.

Las temperaturas máximas medias mensuales registradas durante el período fue de 17.8 °C en el mes de Enero y una mínima de 13.4 °C registrada en el mes de Julio.

La enfermedad mas comúnmente diagnosticada corresponde a Trichodiasis causada por *Trichodina*, ectoparasito ciliado que afecta a los peces de cultivos y que se ha controla utilizando baños con formalina a una dosis de 1:4000 durante una hora con flujo detenido y oxigenación.

Todos los peces muestreados fueron extraídos de los estanques 16, 17 y 18 en los cuales se cultivan peces pertenecientes al batch identificado como H-7 Y F-6 pertenecientes a una población de 15.000 peces de una edad aproximada de 4,5 años de edad y un peso promedio de 1,5 kilos.

Los pesos y longitudes de los peces muestreados se encuentran tabulados en el anexo No. 1, siendo el peso promedio de 1,63 kg y la longitud promedio de 29.27 cm.

5.2.- HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EXTERNOS

El anexo No. 2 describe los hallazgos macroscópicos externos presentes en cada uno de los 14 peces analizados. Todos los peces presentan nódulos individuales o múltiples que se proyectan desde la superficie de la piel, los cuales se caracterizan por ser de color rosado a rojo, con un tamaño que varía desde 0,4 cm a 1,5 cm y consistencia blanda (Fotos No. 1 a la No. 6). De los peces analizados 9 presentaron nodulaciones múltiples y 5 presentaron nódulos individuales. En relación a la ubicación las nodulaciones 10 de los 14 peces analizados las presentan en la región de la cabeza, 3 peces presentan lesiones en las aletas y un pez presenta las lesiones en la superficie del cuerpo.

5.3.- EXAMEN DE FROTIS FRESCO DE PIEL, BRANQUIAS, LESIONES Y EXAMEN EN FRESCO DE BRANQUIAS

En el 100 % de los frotis frescos de piel, branquias y examen en fresco de branquias no se detectaron hallazgos relevantes.

A partir de los frotis frescos de las lesiones se pudo determinar la presencia de hifas septadas, hialinas en 8 de los 14 peces analizados.

5.4.- HALLAZGOS MACROSCÓPICOS INTERNOS

El examen de los órganos internos de los peces post mortem reveló un aumento del volumen del riñón en 7 de los 14 peces analizados (2 de los cuales se encontraban severamente aumentados de volumen), presencia de nódulos en el riñón, de color blanco grisáceo de aproximadamente 0.5 a 1 mm de diámetro en 2 de los 14 peces analizados. El hígado se presentó, pálido en 5 de los 14 peces analizados y se observó el bazo aumentado de volumen en 4 de los 14 peces analizados. Todos los peces analizados presentaban escaso a moderado contenido de alimento en el sistema digestivo.

En el resto de los órganos examinados no se detectaron alteraciones.

5.5.- BACTERIOLOGÍA

En el 100 % de los cultivos realizados a partir de branquias y órganos internos (riñón e hígado) no se detectó desarrollo bacteriano.

En los cultivos realizados a partir de las lesiones externas de 13 de los 14 peces analizados no se detectó desarrollo bacteriano. A partir de los cultivos realizados de las lesiones externas del pez No. 10 se observó en Agar soya tripticasa enriquecido con 2 % de sal, crecimiento de colonias redondas de color amarillo y borde liso; a partir del aislamiento primario se pudo caracterizar mediante la tinción Gram a las bacterias como bacilos Gram - rectos o levemente curvados. A partir del código de lectura determinado mediante el sistema API 20 E, se pudo determinar que el perfil bioquímico de la colonia corresponde a *Pseudomona sp.*

5.6.- HISTOPATOLOGÍA

En el anexo No. 3 se describen los exámenes histopatológicos (clave de muestra, órgano, tinción y observaciones) correspondientes a las muestras de tejidos de 9 peces de los 14 peces.

Las secciones de musculatura a nivel de las nodulaciones, presentaron una severa reacción inflamatoria con presencia de macrófagos y fibroblastos con múltiples granulomas que encierran focos de tejido necrótico (Fotos No. 7 y No. 10). Con la tinción Grocott se pudo establecer la presencia de hifas en el centro de los granulomas (Foto N° 8) las cuales son de color café, septadas y presentan ramificaciones (Foto N° 9). Con la tinción PAS las hifas se tiñen de color rojo (PAS positivo) (Foto N° 11).

El riñón se presentó alterado en 3 de 9 peces analizados. La reacción corresponde a la formación de un gran granuloma con una amplia zona de necrosis central. Con la tinción Grocott se pudo establecer cantidades variables de hifas septadas, de color café. Con la tinción PAS se pudo observar sólo algunas hifas.

El hígado presentó infiltración glicogénica en 4 de las 9 muestras analizadas.

El bazo presentó una hiperplasia de las células macrofágicas en 2 de las 9 muestras analizadas; presencia de focos aislados de necrosis con reacción histiocitaria en 1 de las 9 muestras analizadas; y presencia de un gran granuloma con centro necrótico, en los cuales se pudo establecer con la tinción Grocott y PAS la presencia de hifas septadas con las mismas características a las observadas en el riñón y musculatura.

No se diagnosticaron alteraciones en el cerebro.

5.7.- MICOLOGÍA

De las muestras sembradas a partir de las lesiones externas de los catorce peces analizados, se obtuvo crecimiento fúngico (de hongos) en Agar Sabouraud 2 % glucosa, Agar extracto de malta y Agar patata glucosa, después de 21 días de incubación.

Las colonias midieron aproximadamente de 2 a 16 mm, de superficie aterciopelada, de color verde a gris (Foto 12 A) y el reverso negro (Foto 12 B). El micelio presentó hifas septadas, hialinas y no se observaron estructuras de reproducción sexual. Se determinó la presencia de conidias que nacen a partir de una célula conidiogénica. De acuerdo a lo descrito en von ARX (1974), este hongo pertenece al Orden Moniliales, Género *Exophiala*.

Utilizando la metodología y clave dicotómica descrita por De Hoog (1977) se determinó que las conidias no poseen base truncada, posee un hylum distintivo, son unicelulares de 5.6-6.8 X 2-2.4 μ , o bicelulares de 6.5-8.5 X 2.2-3.5 μ , lisas, hialinas, elipsoidales, cilíndricas o algo claudiforme y se originan en sucesión a partir de una célula conidiogénica. La célula conidiogénica es subglobosa y la estructura de soporte es hialina. Con los antecedentes mencionados se pudo establecer que la colonia pertenece a la especie *Exophiala salmonis*. Posteriormente se compararon los antecedentes con las características descritas del holotipo de *Exophiala salmonis* por Carmichael (1966) y De Hoog (1977) y confirmando de esta forma el diagnóstico de la especie.

No se obtuvo desarrollo fúngico a partir de los macerados realizados de las muestras de órganos internos (hígado, bazo, riñón).



Foto No. 1: Presencia de múltiples nodulaciones en la región cefálica de Turbot (*S. maximus*) afectado por *Exophiala salmonis*, correspondientes al pez número 1.



Foto No. 2: Detalle de las múltiples nodulaciones en la región cefálica de Turbot (*S. maximus*) afectado por *Exophiala salmonis*, correspondiente al pez número 1.



Foto No. 3: Presencia de múltiples nodulaciones en la región cefálica de Turbot (*S. maximus*), afectado por *Exophiala salmonis*, correspondiente al pez número 2.

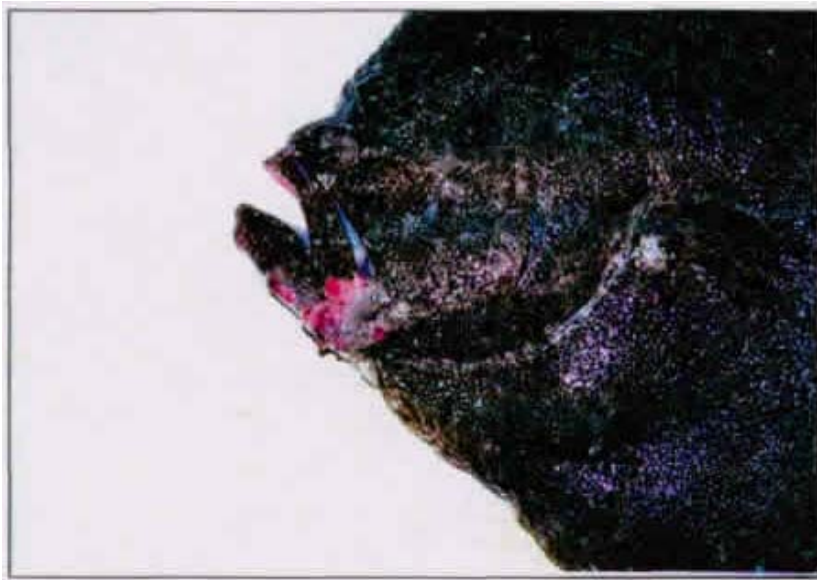


Foto No. 4: Presencia de múltiples nodulaciones en la región inferior del opérculo de Turbot (*S. maximus*), afectado por *Exophiala salmonis*, correspondiente al pez número 3.

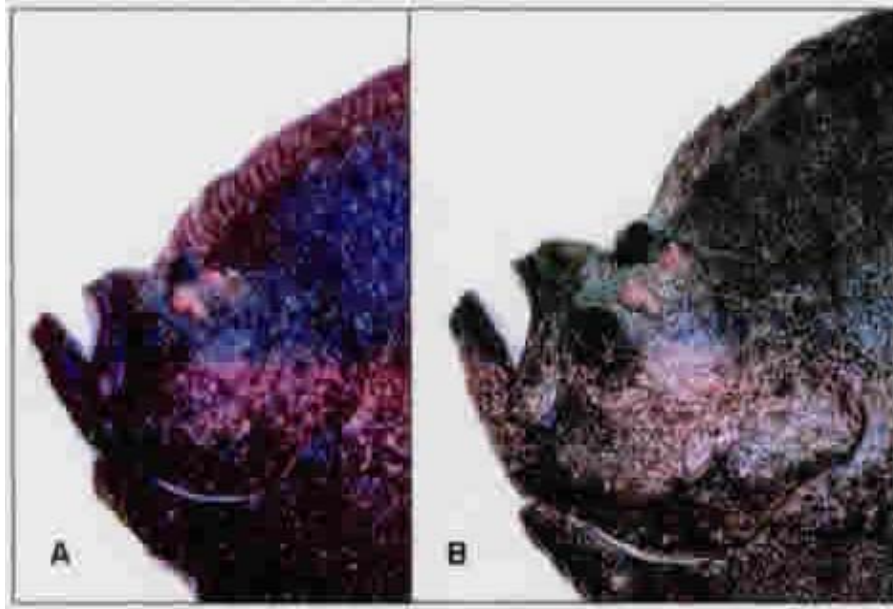


Foto No. 5: Presencia de múltiples nodulaciones en la región cefálica de Turbot (*S. maximus*) afectado por *Exophiala salmonis*, correspondientes a los peces número 4 (A) y 5 (B).

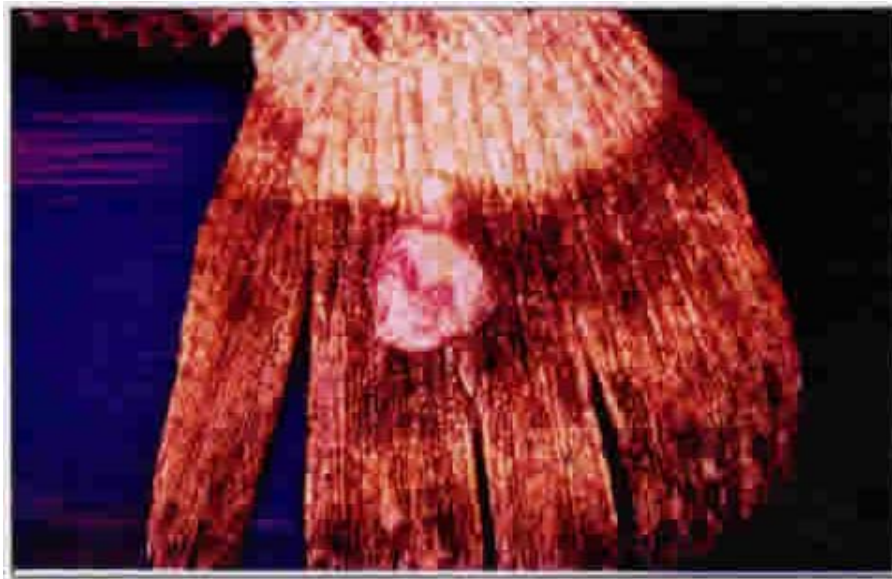


Foto No. 6: Presencia de nodulación de la aleta caudal de Turbot (*S. maximus*) afectado por *Exophiala salmonis*, correspondiente al pez número 6.



Foto No. 7: Sección de la musculatura de Turbot (*S. maximus*) afectado por *Exophiala salmonis*, a nivel de los nódulos. Presencia de múltiples granulomas y reacción inflamatoria periférica, la "E" indica la epidermis (H & E, 50 X).

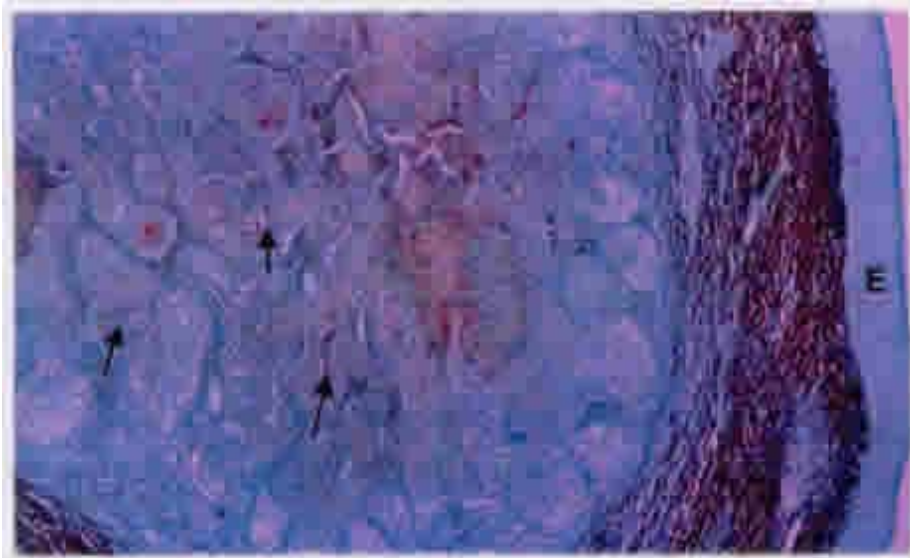


Foto No. 8: Sección de la musculatura de Turbot (*S. maximus*) afectado por *Exophiala salmonis*, a nivel de los nódulos. Se observa la invasión de la musculatura por granulomas con presencia de hifas (flechas), la "E" indica la epidermis (Grocott, 50 X).

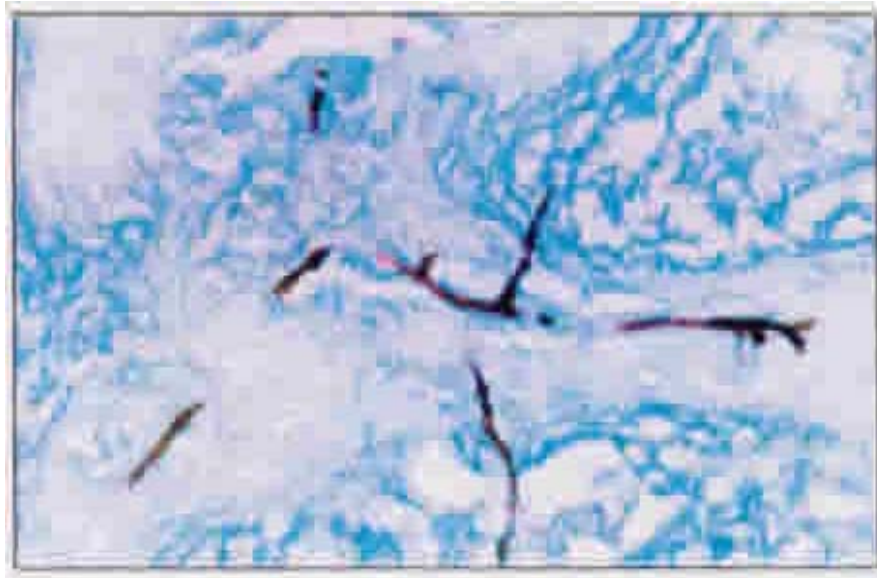


Foto No. 9: Detalle de hifas septadas de *Exophiala salmonis*, presentes en la musculatura (Grocott, 400 X).

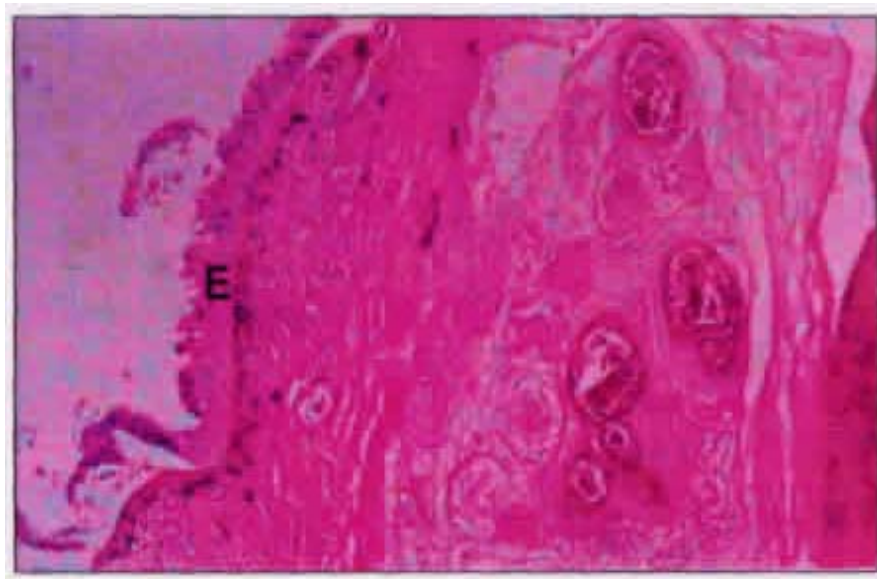


Foto No. 10: Sección de la musculatura de Turbot (*S. maximus*) afectado por *Exophiala salmonis*, a nivel de los nódulos. Presencia de múltiples granulomas, la "E" indica la epidermis (PAS, 50 X).

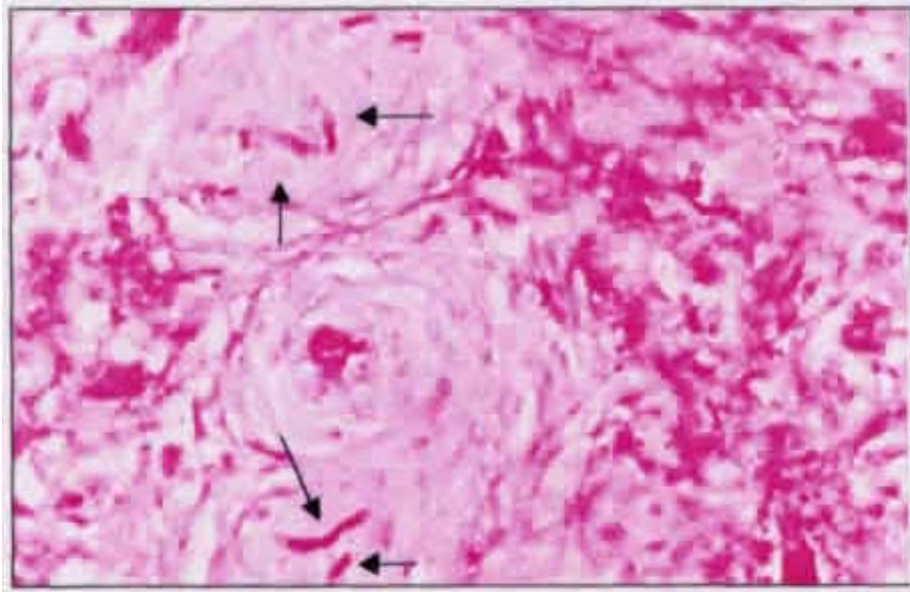


Foto No. 11: Detalle de los granulomas con presencia de hifas (flechas) en la musculatura (PAS, 400 X).

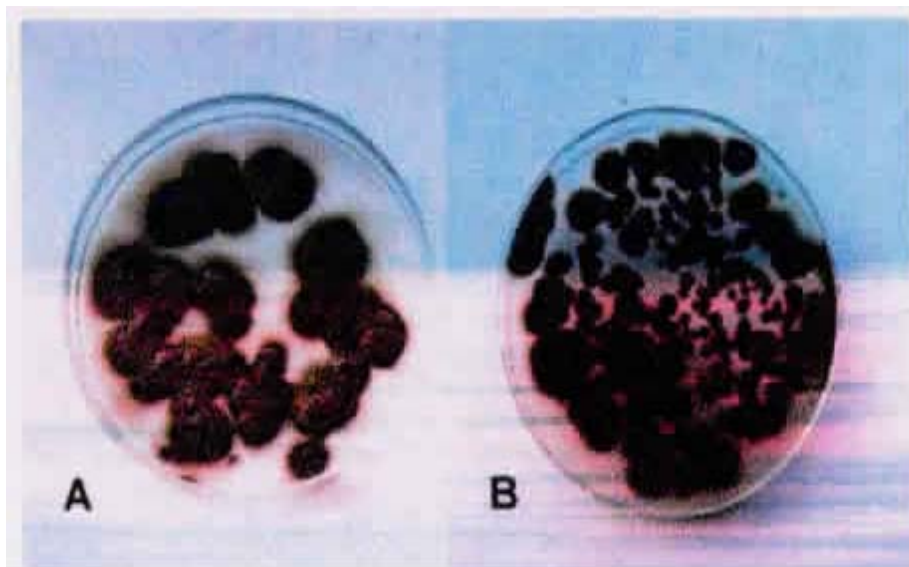


Foto No. 12: Colonias de *Exophiala salmonis* provenientes de Turbot (*S. maximus*), sembradas en Agar Sabouraud después de 21 días de crecimiento. (A) vista superior de la placa, (B) reverso de la placa.

6.- DISCUSION

El presente trabajo constituye el primer reporte en Chile de una micosis sistémica asociada a *Exophiala salmonis*, el primer reporte a nivel mundial que afecta al turbot (*Scophthalmus maximus*) y el primer reporte de esta naturaleza en sistemas de cultivo en estaqués, lo que complementa casos similares informados en otras especies por Carmichael (1966), Fijan (1969), McGinnis y Ajello (1974), Richards y col. (1978), Blazer y Wolke (1979), Otis y col. (1985) y Langvad y col. (1985). Se debe señalar que en Chile existe un antecedente de una micosis sistémica asociada a un hongo que probablemente pertenece al género *Exophiala*, sin embargo no se ha podido establecer las características de las hifas o aislar el agente (Fariás, 1999¹¹).

Se ha descrito que *Exophiala salmonis* es un habitante normal del suelo, agua, y superficie de vegetales (De Hoog, 1977), por lo tanto es razonable señalar que este agente normalmente habita en los cultivos de peces y que la manifestación de la enfermedad se produce en peces que presentan una condición predisponente de inmunosupresión debido a la edad u otros factores.

Los signos clínicos externos asociados a infecciones producidas por *Exophiala salmonis* difieren de la especie en la cual se presenta. En el caso del Turbot (*S. maximus*) las lesiones corresponden a nodulaciones múltiples, localizadas en la superficie del cuerpo, preferentemente en la cabeza, de color rojo a blanco; Carmichael (1966) describe en trucha la presencia de signos nerviosos (natación errática, movimiento en espiral), exoftalmia y abultamiento de la cabeza; Fijan (1969) describe en channel catfish (*I. punctatus*) la presencia de úlceras en la piel e inflamación y protrusión del ano; en salmón del Atlántico (*S. salar*) se describe la presencia de distensión del abdomen, dificultad para controlar los movimientos, hemorragias en la superficie ventral y la presencia de úlceras (Richards y col., 1978; Otis y col., 1985); por último Blazer y Wolke (1979), describen la presencia masas dérmicas atribuidas a *Exophiala* en *X. ringens* (pez trigre) y *H. hudsonius* (caballito de mar) como masas dérmicas externas en la cabeza y mandíbula. Lamas y col. (1990) reportan lesiones en la superficie de la piel de turbot (*S. maximus*) que se ubican en la piel de tamaño variable, distribuidas aleatoriamente y que presentan un centro circular rojo que corresponde a un papiloma epidermal, similares a las lesiones externas descritas en este trabajo.

¹¹ Comunicación Personal: Dr. Carlos Fariás. Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Entre los signos macroscópicos de los órganos internos se encuentra la presencia de hígado pálido, hallazgo que puede ser asociado a la infiltración glicogénica que presentan los peces; aumento de volumen del riñón y bazo que corresponde a la respuesta inflamatoria frente a la infección; y presencia de nódulos en el riñón. Las lesiones macroscópicas producidas por *Exophiala* en los órganos internos en otras especies corresponden a la presencia de nódulos de tamaño variable en todos los órganos internos, adhesiones de los órganos y aumento de volumen del riñón (Fijan, 1968; Richards y col., 1978; Otis y col., 1985 y Blazer y Wolke, 1979).

Las manifestaciones histopatológicas del cuadro corresponden a la formación de granulomas con un centro necrótico rodeados de una respuesta inflamatoria crónica presente en la musculatura, riñón y bazo. Similares hallazgos han sido descritos en estos órganos en infecciones causadas por *Exophiala* en otras especies de peces (Carmichael, 1966; Fijan, 1969; Richards y col., 1978; Otis y col., 1985 y Blazer y Wolke, 1979), sin embargo a diferencia de otras especies, en turbot (*S. maximus*), no se registraron lesiones histopatológicas en el cerebro, vejiga natatoria (ya que ésta se reabsorbe en los primeros estadios de vida) y sistema digestivo dado que este no fue analizado histológicamente por no presentar alteraciones macroscópicas en la necropsia.

La inflamación crónica, con desarrollo de una lesión proliferativa que progresa a fibrosis es una característica de muchas enfermedades de peces, denominándose la lesión como granuloma. Posteriormente la lesión progresa desarrollando un centro necrótico que contiene el material celular del agente, rodeado por una capa de macrófagos y otras células inflamatorias (Roberts, 1978). Entre los agentes involucrados en la formación de granulomas podemos encontrar a cuerpos extraños (Balouet y Baudin, 1986), bacterias tales como *Nocardia* y *Mycobacterium* y hongos como *Ichthyophonus hoferi*, *Phialophora* y *Exophiala* (Roberts, 1978; Ellis y col., 1983; Ferguson, 1989).

La presencia de hifas fue asociada principalmente a los centros necróticos de los granulomas en la musculatura, riñón y bazo. La diseminación de los hongos en los órganos puede llevarse a cabo por medio de extensión a partir del peritoneo a la musculatura adyacente o por diseminación vía hematogena a órganos tales como corazón, hígado y bazo (Richards, 1978). Es probable que en el caso descrito los dos procesos ocurran en forma simultánea, predominando la diseminación por extensión en la musculatura y la vía hematogena en los órganos de la cavidad abdominal (riñón y bazo).

La ruta de ingreso de la infección es de mucha relevancia. Como vía de entrada se ha postulado la vejiga natatoria, principalmente en especies salmonídeas, ya que poseen una conexión con el esófago que pueden llenarla con aire y puede contaminarse con alimento, el cual puede ser colonizado posteriormente por patógenos secundarios (Richards, 1978; Ellis y col., 1983), situación poco probable en especies de peces planos tales como el turbot (*S. maximus*), ya que reabsorben la vejiga en estados juveniles del desarrollo. También se ha postulado vía los uréteres o por los conductos mesonéfricos de la cloaca en cuyo caso la infección primaria ocurriría en el riñón o por la vía digestiva en cuyo caso la infección primaria se encontraría a nivel intestinal (Richards, 1978).

En este estudio no se pudo establecer la presencia de otro patógeno asociado al cuadro, a excepción de la presencia de bacterias del género *Pseudomona* registrada a partir de los cultivos microbiológicos realizados de la lesión externa de un pez, lo más probable es que constituya una infección secundaria. Además, se estableció una fuerte asociación entre la presencia de hifas en las lesiones externas (frotis fresco y cultivos) y en las lesiones hispatológicas, por lo tanto es altamente probable que el organismo causal sea *Exophiala salmonis*. Sin embargo es necesario inocular el agente y reproducir el cuadro en forma experimental para llegar a una conclusión definitiva de manera de cumplir con los postulados de Koch.

Por último este estudio establece que de acuerdo a los estudios macro y microscópicos realizados y a la literatura micológica consultada, el hongo aislado de las lesiones presentadas por los peces de la especie *S. maximus* corresponde a ***Exophiala salmonis***.

CONCLUSIONES

De la presente investigación se concluye:

Exophiala salmonis se asocia fuertemente a un cuadro micótico sistémico en turbot (*Scophthalmus maximus*), lo que se constituye como el primer registro en la especie, en el país y sistema de cultivo.

Los hallazgos histopatológicos señalan que el cuadro es de tipo crónico con formación de granulomas con centro necrótico.

Se recomienda que las investigaciones posteriores se orienten a determinar mediante los postulados de Koch, el mecanismo de ingreso del agente al organismo y la forma de diseminación interna.

7.- BIBLIOGRAFIA

- ARX von, J.A. 1974. The genera of fungi. Sporulating in pure culture. J. Cramer. Germany.
- BALOUET, G., F. Baudin Laurencin. 1986. Granulomatous nodules in fish: an experimental assessment in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). J. Fish Dis. 9: 417-429 p.
- BLAZER, V.S., R. E. Wolke. 1979. An Exophiala-like fungus, as cause of a systemic mycosis of marine fishes. J. Fish. Dis. 2: 145-152 p.
- BROWN, L. 1993. Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine. Pergamon Press, New York.
- CARMICHAEL, J. W. 1966. Cerebral mycetoma of trout due to a Phialophora-like fungus. Sabouraudia 6: 120-123 p.
- CASTRIC, J. 1997. Viral diseases in fish mariculture. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 17(6): 220-228 p.
- COMPENDIO DE LA ACUICULTURA Y LA PESCA DE CHILE. 1999. Ediciones Technopress S.A. 258 p.
- DE HOOG, G.S. 1977. Studies in Mycology. No. 15. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- ELLIS, A. E., I.F. Waddell, D.W. Minter. 1983. A systemic fungal disease in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., caused by a species of Phialophora. J. Fish Dis. 6: 511-512 p.
- FERGUNSON, H.W. 1989. Systemic Pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in disease of teleosts. Iowa State University Press, Ames, IA.
- FERNANDEZ, J. 1996. IV Actualización del manual de cultivo del Rodaballo: Patología. Ediciones Insuñá. 200 p.
- FIJAN, N. 1969. Systemic mycosis in Channel catfish. Bull. Wildl. Dis. Assoc. 5: 109-110p.
- GANTER, P., J. Jollés. 1970. Histochemie Normale et Pathologique. Tome III. Gauthier-Villars. París.

- LAMAS, J., R. Anadón, S. Devesa, A. Toranzo. 1990. Visceral neoplasia and epidermal papillomas in culture turbot (*Scophthalmus maximus*). Dis. Aquat. Org. 8: 179-187 p.
- LANGVAD, F., O. Pedersen, K. Engjom. 1985. A fungal disease caused by *Exophiala* sp. nova in farmed Atlantic salmon in western Norway. In Fish and shellfish Pathology, de. A. E. Ellis, Orlando, Fla.: Academic Press. 323-328 p.
- LUNA, L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGrawHill Book Company New York.
- MCGINNIS, M. R., C. Ajello. 1974. A new species of *Exophiala* isolated from channel catfish. Mycologia 66: 518-520 p.
- NOVOA, B., S. Nuñez, C. Fernández-Puentes, A.J. Figueras and A.E. Toranzo. 1992. Epizootic study in a Turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology. Aquaculture 107: 253-258
- OTIS, E.J., R.E. Wolke, V.S. Blazer. 1985. Infection of *Exophiala salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Wildl. Dis. 21: 61-64
- RICHARDS, R. H., A. Holliman and S. Helgason. 1978. *Exophiala salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 1: 357-368 p.
- ROBERTS, J. R. 1978. Fish Pathology. Bailliere Tindall, London.
- SOUTAR, R. 1993. The Veterinary Approach to Turbot. In: Aquaculture for Veterinarians: Fish husbandry and medicines. Pergamon Press, New York.
- STOSKOFF, M.K. 1992. Fish Medicine. W.S. Saunders Company, United States of America.
- TORANZO, A. E., L. Barja. 1993. Fry mortality syndrome (FMS) in Spain, isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 13(1):30p.
- TORANZO, A. E., J. L. Barja, S. Devesa. 1993. An overview of the main infectious problems in cultured turbot: Present status and future necessities. Proceeding of the Turbot Workshop. World Aquaculture 1993, Torremolinos, Spain. 24 p.

8.- ANEXOS

Anexo N° 1: Peso y longitud de Turbot (*Scophthalmus maximus*) analizados, afectados por *Exophiala salmonis*.

No. de pez	PESO (kg)	LONGITUD (cm)
1	1.42	29.0
2	1.15	33.0
3	1.72	30.5
4	1.54	29.5
5	1.83	30.5
6	1.61	30.5
7	1.76	30.5
8	1.68	29.5
9	1.57	28.3
10	1.63	25.4
11	1.65	24.9
12	1.76	29.2
13	1.86	30.8
14	1.70	28.2
Promedio	1.63	29.27

Anexo N° 2: Descripción de los hallazgos macroscópicos externos registrados en 14 Turbot (*S. maximus*), afectados por *Exophiala salmonis*.

PEZ NO.	HALLAZGOS EXTERNOS
1	Presencia de múltiples nódulos en la región cefálica que se proyectan desde la superficie de la piel, de 1 a 1,5 cm aproximadamente, de color rojo, consistencia blanda.
2	Presencia de múltiples nódulos en la región cefálica que se proyectan desde la superficie de la piel, de 0,8 a 1,0 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
3	Presencia de múltiples nódulos en la región de la mandíbula que se proyectan desde la superficie de la piel, de 0,4 a 0,8 cm aproximadamente, de color rojo y consistencia blanda.
4	Presencia de múltiples nódulos en la región cefálica, que se proyectan desde la superficie de la piel, de 1,0 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
5	Presencia de múltiples nódulos en la región cefálica, que se proyectan desde la superficie de la piel de 1,2 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
6	Presencia de un nódulo en la aleta caudal, que se proyectan desde la superficie de la piel de 1,5 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
7	Presencia de múltiples nódulos en la aleta caudal, que se proyectan desde la superficie de la piel de 1,2 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
8	Presencia de múltiples nódulos en la aleta caudal, que se proyectan desde la superficie de la piel de 1,2 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
9	Presencia de un nódulo en la región cefálica, que se proyectan desde la superficie de la piel de 1,0 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
10	Presencia de múltiples nódulos en la región cefálica, que se proyectan desde la superficie de la piel de 1,0 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
11	Presencia de un nódulo en la línea media de la superficie corporal del lado ocular, que se proyectan desde la superficie de la piel de 1.5 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
12	Presencia de un nódulo en la región cefálica, que se proyectan desde la superficie de la piel de 0,6 cm aproximadamente, de color rosado y consistencia blanda.
13	Presencia de múltiples nódulos en la parte inferior del opérculo del lado ciego de que se proyectan desde la superficie de 0,3* a 1 cm, de color variable (rosado a rojo) y consistencia blanda.
14	Presencia de un nódulo en la región media del opérculo, que se proyectan desde la superficie de la piel de 0,5 cm aproximadamente, de color rojo y consistencia blanda.

Anexo N° 3: Descripción histopatológica correspondientes a las muestras de tejidos de 9 Turbot (*S. máximas*), afectados por *Exophiala salmonis*.

MUESTRA	ORGANO	TINCION	OBSERVACIONES
166-99E	PIEL	H&E	En la profundidad de la musculatura se observa una severa reacción inflamatoria con presencia de macrófagos y fibroblastos con múltiples granulomas que encierran focos de tejido necrótico.
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.
	RIÑON	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Sin alteraciones.
		PAS	Sin alteraciones.
	BAZO	H&E	Focos aislados de necrosis con reacción histiocitaria.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	HIGADO	H&E	Infiltración glicogénica.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	CEREBRO	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
167-99E	PIEL	H&E	En la profundidad de la musculatura se observa una severa reacción inflamatoria con presencia de macrófagos y fibroblastos con múltiples granulomas que encierran focos de tejido necrótico.
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.
	RIÑON	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	HIGADO	H&E	Infiltración glicogénica.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.

MUESTRA	ORGANO	TINCION	OBSERVACIONES	
168-99E	PIEL	H&E	Severa reacción inflamatoria crónica, que se extiende desde bajo la epidermis hasta muy profundamente en el tejido muscular, presentando múltiples granulomas con centro necrótico.	
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.	
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.	
	RIÑON	H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
	BAZO	H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
	HIGADO	H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
	CEREBRO	H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
	169-99E	RIÑON	H&E	Presencia de un gran granuloma con una amplia zona de necrosis central.
			GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
			PAS	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
BAZO		H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
HIGADO		H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
CEREBRO		H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	

MUESTRA	ORGANO	TINCION	OBSERVACIONES	
170-99E	PIEL	H&E	La dermis presenta marcada inflamación crónica, con abundante fibrosis. Esta inflamación penetra profundamente en la musculatura encontrándose algunos pequeños granulomas con centro	
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.	
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro de granulomas.	
	RIÑON	H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
	BAZO	H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
	HIGADO	H&E	Sin alteraciones.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
	171-99E	RIÑON	H&E	Presencia de un gran granuloma con una amplia zona de necrosis central.
			GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
			PAS	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
BAZO		H&E	Hiperplasia de células macrofágicas.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	
HIGADO		H&E	Infiltración glicogénica.	
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.	
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.	

MUESTRA	ORGANO	TINCION	OBSERVACIONES
172-99 E	PIEL	H&E	Múltiples granulomas que presentan centro necrótico, rodeados por una severa reacción inflamatoria crónica.
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
	RIÑON	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	BAZO	H&E	Presencia de granulomas de gran tamaño con centro necrótico.
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
	HIGADO	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	CEREBRO	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.

MUESTRA	ORGANO	TINCION	OBSERVACIONES
173-99E	PIEL	H&E	Múltiples granulomas que presentan centro necrótico, rodeados por una severa reacción inflamatoria crónica.
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
	RIÑON	H&E	Presencia de un gran granuloma con una amplia zona de necrosis central.
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
	BAZO	H&E	Hiperplasia de células macrofágicas.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	HIGADO	H&E	Infiltración glicogénica.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	CEREBRO	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.

MUESTRA	ORGANO	TINCION	OBSERVACIONES
175-99 E	PIEL	H&E	Múltiples granulomas que presentan centro necrótico, rodeados por una severa reacción inflamatoria crónica.
		GROCOTT	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
		PAS	Presencia de hifas septadas en el centro del granuloma.
	RIÑON	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	BAZO	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	HIGADO	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.
	CEREBRO	H&E	Sin alteraciones.
		GROCOTT	Negativo a la presencia de hifas.
		PAS	Negativo a la presencia de hifas.

Anexo N°4: Temperaturas promedio mensual registradas durante el período de estudio en el Centro de Engorda Granjamar

