



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

FRECUENCIA DE *Yersinia ruckeri* EN UN PISCIGRANJA DEL VALLE DEL
MANTARO BAJO EL CONTEXTO DE SU VARIABILIDAD CLIMÁTICA
ESTACIONAL

Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO

JAHIR ANICAMA DIAZ
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA

LIMA – PERÚ

2011

INDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTAS DE GRÁFICAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA	2
2.2 SITUACIÓN DE LA VARIABILIDAD CLIMÁTICA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO	5
2.2.1 Variabilidad Climática y Cambio Climático a Escala Global	5
2.2.2 Estado Situacional del Clima Actual, Variabilidad Climática y el Cambio Climático en el Valle del Mantaro	6
2.3 LA ACUICULTURA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO	11
2.3.1 Emergencia de enfermedades en animales acuáticos	12
2.3.2 El sector acuícola como medio de vida sostenible	14
2.4 EL MICROORGANISMO	15
2.4.1 Características generales	15
2.4.1.1 Tipificación de microorganismo	16
2.4.2 Factores de virulencia	17
2.4.2.1 Toxinas extracelulares	17
2.4.2.2 Adhesinas e invasinas	18
2.4.2.3 Ruckerbactina	18
2.4.2.4 Plásmidos	18
2.4.2.5 Sistema de secreción tipo III	19
2.4.2.6 Sistema de secreción tipo IV	19
2.5 LA ENFERMEDAD	19
2.5.1 Hospedero	19
2.5.1.1 Patogénesis	20
2.5.1.2 Respuesta inmune de los peces	22
2.5.1.3 Signos clínicos	22
2.5.1.4 Hallazgos Histopatológicos	23
2.5.2 Medio Ambiente	24
2.5.3 Epidemiología	25
2.5.4 Diagnóstico	25
2.5.5 Control y Prevención	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29

3.1	DISEÑO EXPERIMENTAL	29
3.1.1	Lugar de Muestreo	29
3.1.2	Piscigranja de Estudio	29
3.1.3	Tamaño de muestra	30
3.1.4	Parámetros de inclusión	30
	3.1.4.1 Muestra biológica	30
	3.1.4.2 Periodo de muestreo	30
3.2	METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS	31
3.2.1	Toma de Muestras	31
3.2.2	Métodos de Diagnóstico	32
	3.2.2.1 Datos Biológicos	32
	3.2.2.1.1 Diagnóstico Histopatológico	32
	3.2.2.1.2 Diagnóstico Bacteriológico	32
	3.2.2.1.3 Diagnóstico Molecular	33
	3.2.2.1.4 Evaluación físico-química del agua	33
	3.2.2.2 Datos Climáticos	33
	3.2.3 Análisis de Datos	33
IV.	RESULTADOS	36
4.1	ANALISIS METEOROLÓGICOS	36
	4.1.1 Precipitación pluvial	36
	4.1.2 Temperaturas	36
4.2	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL AGUA	38
4.3	DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO	39
	4.3.1 Resultados Histopatológicos	39
	4.3.1.1 Estomago	39
	4.3.1.2 Branquias	40
	4.3.1.3 Riñón	41
	4.3.1.4 Intestino delgado	42
	4.3.1.5 Ciegos Pilóricos	42
	4.3.1.6 Bazo	43
	4.3.2 Asociación entre el Diagnóstico Bacteriológico y el Diagnóstico Molecular para <i>Yersinia ruckeri</i>	43
	4.3.3 Asociación de Descripción Histopatológica y el Diagnóstico para la presencia de <i>Yersinia ruckeri</i>	44
	4.3.3.1 Hígado	44
	4.3.3.2 Riñón	45
	4.3.3.3 Branquias	45
	4.3.3.4 Estómago	45
	4.3.3.5 Ciego	46
	4.3.3.6 Bazo	46
V.	DISCUSIÓN	47
VI.	CONCLUSIONES	52
VII.	LITERATURA CITADA	53
VIII.	APÉNDICES	60

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia del agente *Yersinia ruckeri* en truchas de cultivo (*Oncorhynchus mykiss*) en dos periodos climatológicos de la cuenca del río Mantaro en el departamento de Junín mediante tres métodos de diagnóstico: molecular, bacteriológico e histopatológico. Los meses de estudio fueron Agosto, Setiembre y Noviembre, los cuales comprendía la época de estiaje y el inicio de la época de lluvias.

Se seleccionaron 180 truchas arcoíris de manera aleatoria de una piscigranja, las cuales fueron necropsiadas, para coleccionar asépticamente muestras de riñón y bazo, para el diagnóstico molecular; muestras de intestino delgado, riñón y bazo, para el diagnóstico bacteriológico; y muestras de intestino delgado, riñón, bazo, branquias, hígado, ciegos pilóricos y estomago para el diagnóstico histopatológico.

Las muestras coleccionadas para el diagnóstico molecular fueron sometidas a la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras coleccionadas para el diagnóstico bacteriológico fueron evaluadas mediante técnicas de aislamiento bacteriano convencional e identificación bacteriana a través de pruebas bioquímicas que caracterizan la actividad metabólica de las bacterias en estudio. Las muestras coleccionadas para el diagnóstico histopatológico para su descripción histológica.

El diagnóstico molecular confirmó la presencia de *Yersinia ruckeri* en la piscigranja de estudio. Tanto el diagnóstico molecular y el diagnóstico bacteriológico coincidieron en 6.5% en el resultado positivo para la presencia de *Yersinia ruckeri*. En el caso de diagnóstico histopatológico reflejó que el tipo y grado de lesiones encontradas en los tejidos no guardan relación con un proceso infeccioso en curso. No se encontró asociación entre las lesiones histopatológicas con el diagnóstico positivo para la presencia de *Yersinia ruckeri* en ninguna de las épocas climatológicas en que se desarrolló el estudio.

Palabras clave: *Yersinia ruckeri*, *Oncorhynchus mykiss*, Junín, precipitaciones.

ABSTRACT

This study aimed to determine the presence of *Yersinia ruckeri* agent in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in two climatic periods of the Mantaro River of the department of Junín by three diagnostic methods: molecular, bacteriological and histopathology. The months of study were in August, September and November, which included the dry season and the beginning of the rainy season. The numbers of animals analyzed were 180.

Kidney and spleen, for molecular diagnosis; samples of small intestine, kidney and spleen for bacterial diagnosis and small intestine samples, kidney, spleen, gills, liver, pyloric caeca and stomach for histopathological diagnosis.

The samples collected for molecular diagnosis were assessed by Polymerase chain reaction (PCR). The samples collected for bacterial diagnosis were assessed by Trypticase Soy cultivation and a battery of biochemical tests. The samples collected for histopathological diagnosis were assessed by a histological description.

Molecular diagnosis confirmed the presence of *Yersinia ruckeri* in fish farm study.

Both the molecular diagnostic bacterial diagnosis were agreed in 6.5% in the positive for the presence of *Yersinia ruckeri*. The histopathological diagnosis reflects the type and extent of lesions founded an unrelated association with an infectious process. No association was found between the histopathological lesions with a positive diagnosis for the presence of *Yersinia ruckeri* in any weather seasons in this study.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, *Oncorhynchus mykiss*, Junín, seasons.

LISTA DE CUADROS

Cuadro N° 1. Extracción de truchas, según utilización y departamento, 2003-2008.

Cuadro N° 2. Climatología de la temperatura mínima y máxima de la estación de Ingenio para los meses de Agosto, Setiembre, Octubre y Noviembre.

Cuadro N° 3. Escenarios climáticos para la Cuenca del río Mantaro. MINAM, 2010.

Cuadro N° 4. Criterios para determinar la presencia de *Yersinia ruckeri* en base a los resultados de del diagnóstico molecular y bacteriológico.

Cuadro N° 5. Tipos de variables a analizar para el estudio

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1. Resumen de las actividades en la cuenca del Mantaro para la adaptación al Cambio Climático. Modificado de MINAM.

Tabla N° 2. Temperaturas tolerantes para diferentes especies cultivables acuícolas.

Tabla N° 3. Impacto Potenciales del Cambio Climático en los sistemas acuícolas.

Tabla N° 4. Datos de las precipitaciones registradas por la estación de Ingenio

Tabla N° 5. Datos de temperatura máxima registrada por la estación de Ingenio.

Tabla N° 6. Datos de la temperatura mínima registrada por la estación de Ingenio.

Tabla N° 7. Datos de diferencial de temperatura diaria registrada por la estación de Ingenio.

Tabla N° 8. Resultado físico-químicos del agua de la piscigranja “El Edén”.

Tabla N° 9. Tabla N° 9. Número de truchas con algún tipo y grado de lesión evaluadas en las tres etapas del estudio.

Tabla N° 10. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido estomacal.

Tabla N° 11. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido estomacal.

Tabla N° 12. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido branquial.

Tabla N° 13. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido branquial.

Tabla N° 14. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido renal.

Tabla N° 15. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido renal.

Tabla N° 16. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido intestinal.

Tabla N° 17. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido intestinal.

Tabla N° 18. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido cecal.

Tabla N° 19. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido cecal.

Tabla N° 20. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido esplénico.

Tabla N° 21. Asociación entre el diagnóstico molecular y el diagnóstico bacteriológico para *Yersinia ruckeri*.

Tabla N° 22. Evaluación de la asociación entre la Degeneración Hepática con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Tabla N° 23. Evaluación de la asociación entre los tejidos renales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Tabla N° 24. Evaluación de la asociación entre los tejidos branquiales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Tabla N° 25. Evaluación de la asociación entre los tejidos estomacales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Tabla N° 26. Cuadro de evaluación de la asociación entre los tejidos cecales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Tabla N° 27. Evaluación de la asociación entre los tejidos esplénicos con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica N° 1. Producción acuícola continental por especies. Información obtenida del Ministerio de Producción (TM)

Gráfica N° 2. Producción de trucha arcoíris en el Perú desde 1993 a 2008 expresada en Toneladas Métricas (TM).

Gráfica N° 3. Mapa de ubicación de la piscigranja “El Edén”.

Gráfica N° 4. Climatología de la precipitación en la Estación de Ingenio.

Gráfica N° 5. Climatología de la temperatura máxima y mínima en la Estación de Ingenio

Gráfica N° 6. Diagrama de cajas de la precipitación mensual en la Estación de Ingenio.

Gráfica N° 7. Descripción de temperatura máxima registrada por la estación Ingenio.

Gráfica N° 8. Descripción de temperatura mínima registrada por la estación Ingenio

Gráfica N° 9. Descripción del rango térmico diario de la estación Ingenio.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BHIC: Caldo cerebro corazón (Del inglés: "Brain Heart Infusion Agar")

CMNUCC: Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático

CMM: células melanomacrófagos.

ENSO: El fenómeno del "El Niño" (Del inglés: "El Niño Southern Oscillation")

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Del inglés: "Food and Agriculture Organization")

FMV-UNMSM: Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INEI: Instituto Nacional de Estadísticas e Informática

IgM: Inmunoglobina de tipo "M".

IGP: Instituto Geofísico del Perú

IPCC: Panel Intergubernamental de Cambio Climático (Del inglés: "Intergovernmental Panel on Climate Change").

H₂S: Acido Sulfhidrico.

KDa: Kilo Daltos.

LIA: Agar Lisina (Del inglés: "Lysine Iron Agar")

LC₅₀%: Concentración Letal

LD₅₀%: Dosis Letal

MAREMEX – Mantaro: Manejo de desastres ante eventos meteorológicos extremos (sequías, heladas y lluvias intensas) como medida de adaptación ante el cambio climático en el valle del Mantaro.

MINAM: Ministerio del Ambiente

OEI: Organismo Mundial de la Sanidad Animal (Del inglés: "World Organization for Animal Health")

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés: "Polymerase Chain Reaction")

PRODUCE: Ministerio de la Producción.

PROMPERU: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo.

PRAA: Proyecto de Adaptación al Impacto del Retroceso Acelerado de Glaciares en los Andes Tropicales.

PROCLIM: Programa de Fortalecimiento de Capacidades Nacionales para manejar el Impacto del Cambio Climático y la Contaminación del Aire.

Ppt: partes por millón.

SCNCC: Segunda Comunicación Nacional de Cambio Climático.

SENAMHI: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú

SEIN: Sistema Eléctrico Interconectado Nacional.

SIM: Sulfuro Indol motilidad

TM: Toneladas métricas.

TCID50: Dosis infectiva de cultivo celular (Del inglés: “Median tissue culture infective dose”)

TSA: Agar Soya Tripticasa (Del inglés: “Trypticasa Soja Agar”)

UNEP: Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (Del inglés: “United Nations Environment Programme”)

UFC: Unidad formadoras de Colonia

Yrp1: Proteasa de la Yersinia (Del inglés: “*Yersinia ruckeri* protease 1”).

I. INTRODUCCIÓN

En la última década la acuicultura continental en el Perú ha desarrollado altos índices de producción, lo cual se ve reflejado en el aumento de las solicitudes para el uso de recursos hídricos para el desarrollo de la acuicultura (PRODUCE, 2008a).

La sanidad acuícola ha estado siguiendo un curso paralelo al crecimiento del sistema productivo. En el Perú, la bacteria *Yersinia ruckeri* representa un riesgo para la crianza de trucha arcoíris afectando la morbilidad y la mortalidad de las poblaciones generando pérdidas económicas. Existen limitados estudios patológicos que sugieren la manifestación de la bacteria y las variables medioambientales que ayudan generar la aparición de brotes infecciosos (Palomino R., 2008).

Los acuicultores de la cuenca del río Mantaro, poseen registros de lesiones compatibles con infección por *Yersinia ruckeri* sobre todo en la época de lluvias, la cual se inicia en el mes de Octubre o Noviembre.

El presente estudio busca reflejar el comportamiento de *Yersinia ruckeri* en dos estaciones climatológicas en el valle del Mantaro: estación de estiaje y de lluvias.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA.

La producción mundial de acuicultura reportó un incremento de 6.3% anuales (FAO, 2003); y el Perú, ha tenido el mismo comportamiento sobre todo en los últimos años. A finales del año 2000, se encontraba con 1 115 derechos otorgados en 10 809 hectáreas de espejo de agua vigentes, actualmente existen 3 130 derechos de acuicultura en 23 103.65 hectáreas de espejo de agua, lo cual señala que la actividad de acuicultura se está convirtiendo en una alternativa para el desarrollo de la población (PRODUCE., 2008a)

En el 2002, según informes de la FAO, sesenta y cuatro países se dedican a la producción de trucha arcoíris siendo la mayoría productores a menor escala en comparación a los principales centros de producción de trucha como Europa, Norteamérica, Chile, Japón y Australia (FAO, 2009).

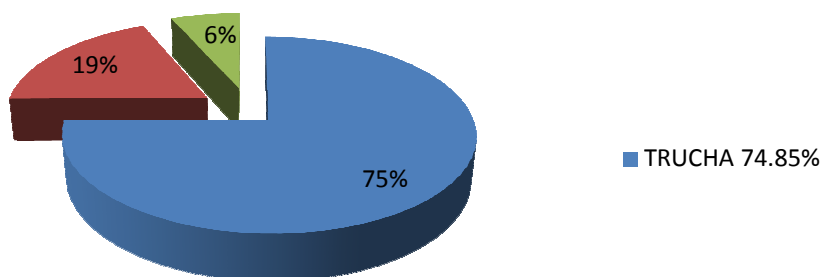
La trucha ha alcanzado un importante desarrollo en diversas regiones, principalmente en zonas altoandinas y su cultivo está dirigido al mercado local y a su vez también está dirigida para la exportación. Existen otras especies producidas en zonas tropicales tales como la gamitana, paco boquichico y tilapia que es cultivada en la selva alta y en la costa norte del país (PRODUCE, 2008a)

A nivel nacional, la producción acuícola continental ha venido incrementándose, así para el año 2007 ascendió a 9 348.67 TM, un incremento de 23.65% con relación al año 2006, dentro de esto, predomina la producción de trucha (74.85%) seguida de la tilapia (18.62%) y otras especies tropicales (6.53%). Las principales empresas dedicadas al cultivo de la trucha se encuentran en Puno y Junín (PRODUCE., 2008a) (Ver Gráfica N° 1).

La región Junín, en la sierra central del Perú, es una de las más importantes zonas de producción de truchas del país, está conformada por asociaciones y piscifactorías, las cuales lograron producir en el año 2003, 1337 TM, en el año 2006, 1651 TM y en el año 2008, 2078 TM (PRODUCE., 2008b).

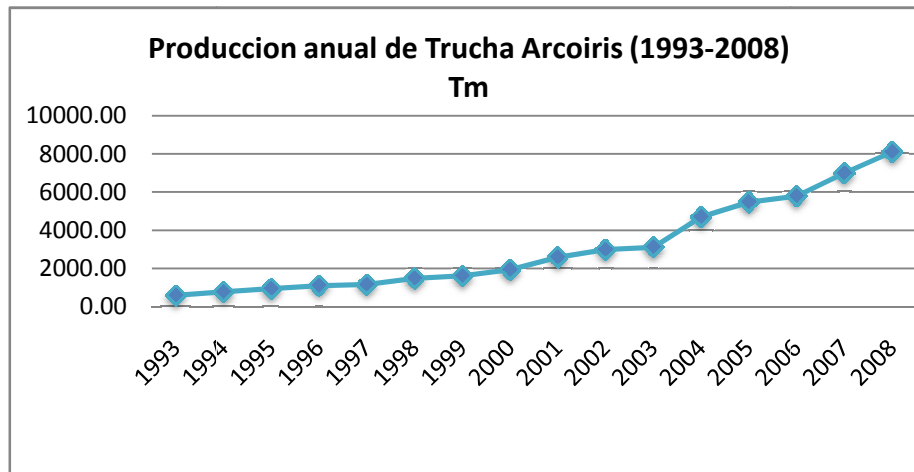
Gráfica N° 1. Producción acuícola continental por especies. Información obtenida del Ministerio de Producción.

PRODUCCION ACUICOLA CONTINENTAL - PERÚ 2007



Considerando solo la producción de trucha en el país, ésta se ha venido incrementando en los últimos 10 años, sobrepasando las 8,000 TM en el 2008 (Ver Gráfica N° 2).

Gráfica N° 2. Producción de trucha arcoiris en el Perú desde 1993 a 2008 expresada en Toneladas Métricas (Tm)



Dentro de los principales recursos de acuicultura se tiene a los langostinos (9 023.36Tm), concha de abanico (3 131.45Tm), trucha (795.35Tm) y tilapia (8.33Tm), con ingresos por USD 78.21 millones. Así mismo, ha habido un incremento en las exportaciones de productos provenientes de la acuicultura, alcanzando las 12 958.49 TM el año 2007, cifra que sobrepasa a la registrada el año 2006 que mostró unas 10 701.27 TM (PRODUCE., 2008a) (Ver Cuadro N° 1). La mayoría de las truchas cultivadas se comercializan en estadio fresco. Algunas truchas provenientes de Junín y Puno son sometidas a un proceso de congelado (INEI, 2010).

Cuadro N° 1. Extracción de truchas, según utilización y departamento, 2003-2008 (Modificado de INEI, 2010).

AÑO	TM	USD
1994	443	904413
1995	183	860724
1996	77	825200
1997	196	514033
1998	116	713896
1999	181	713896
2000	207	968787
2001	276	1182251
2002	361	1458385
2003	441	1616395
2004	422	1809828
2005	754	3279426
2006	857	4204158
2007	795	4919866
2008	609,27	3606232

Los principales países de exportación de trucha de nuestro país son Canadá, Estados Unidos, Suecia, Noruega y Alemania realizándose principalmente en dos formas, la de filete y la de trucha entera o HG (sin cabeza, sin vísceras) (PROMPERU, 2009).

La importancia de la cuenca del río Mantaro radica en los siguientes puntos (MINAM, 2010):

- La seguridad alimentaria del país depende en gran medida de esta cuenca, pues provee de alimentos a Lima, capital del Perú, que alberga el 30% de la población.
- La cuenca del Mantaro es de gran importancia económica por ser el principal centro de generación de energía eléctrica del país, ya que abastece el 37.6% de la demanda del Sistema Eléctrico Interconectado Nacional.
- Sus poblaciones son vulnerables a la ocurrencia de eventos climáticos extremos, porque sus principales actividades económicas, la agricultura y la ganadería, dependen de la disponibilidad del agua.

2.2 SITUACIÓN DE LA VARIABILIDAD CLIMÁTICA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO.

2.2.1 Variabilidad Climática y Cambio Climático a Escala Global.

Según a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) define a este proceso como una variación del clima atribuida directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante periodos de tiempo comparables (IGP, 2005b; UNEP, 2010).

El cambio climático podría alterar significativamente los comportamientos de producción, distribución y consumo como también sobre los estilos de vida de las poblaciones de las sociedades modernas (MINAM, 2010; UNEP, 2010).

Principalmente se tienen como desafíos ante este proceso global dos puntos: adaptarnos a nuevas condiciones climáticas y trabajar para mitigar la emisión de los gases de efecto invernadero para cada una de las actividades productivas.

Evidencia científica revela que el cambio climático se manifiesta actualmente de una manera gradual; pero, presenta tendencias al alza en indicadores como la temperatura, cambios en el comportamiento de las lluvias, elevación del nivel del mar así como también variaciones en la frecuencia e intensidad de los eventos meteorológicos extremos (IGP, 2005b; Handisyde, 2006).

Bajo el esquema del Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) la evaluación de impactos climáticos busca cuatro objetivos bien definidos: detección de las causas del cambio climático; medida de sus efectos (biofísicos y socioeconómicos), identificación de vulnerabilidades y análisis de ajustes y respuestas (IGP, 2005b). Uno de los indicadores más resaltantes para el Cambio Climático en ecosistemas Altoandinos es el proceso de deshielo de los glaciares.

El Perú, presenta el 70 % de los glaciares tropicales, lo que indica que en nuestro país, en donde los glaciares ofrecen diferentes beneficios a la población como el aprovisionamiento de agua potable en el valle del Mantaro, proyectos agrícolas como el de Chavimochic, etc. (IGP, 2005b; UNEP, 2010; MINAM, 2010).

2.2.2 Estado Situacional del Clima Actual, Variabilidad Climática y el Cambio Climático en el Valle del Mantaro.

La cuenca del río Mantaro ha sido reconocida como una de las cuencas piloto para el estudio del cambio climático y sus impactos, a través del Programa de Fortalecimiento de Capacidades Nacionales para manejar el Impacto del Cambio Climático y la Contaminación del Aire (PROCLIM) que fue implementado por la Consejo Nacional del Ambiente (CONAM), como parte de la aplicación de la Estrategia Nacional de Cambio Climático en el Perú (CONAM, 2005). El PROCLIM, fue implementado en 3 cuencas piloto, elegido a base a la actividad económica que se desarrolla, siendo éstas: la cuenca del río Piura, Santa y el Mantaro.

Así mismo en la Segunda Comunicación Nacional Cambio Climático (SCNCC) se ha determinado cuatro cuencas prioritarias para la implementación de proyectos de vulnerabilidad en el país. La elección de estas cuencas se hizo a través de un mapa integrado compuesto por la confluencia de tres mapas base: Mapa de Peligros Climáticos, Mapa de Agrobiodiversidad y Mapa de Índice de Desarrollo Humano del Perú (MINAM, 2010).

Para el caso del Mantaro, fueron identificados como los principales peligros las heladas, sequías y los fenómenos geodinámicos externos, tales como deslizamientos, huaycos, erosión de suelos y sedimentación de ríos (IGP, 2005; MINAM, 2010).

Las precipitaciones en el valle del Mantaro tienen un ciclo anual bien marcado, caracterizado por una temporada lluviosa que dura entre setiembre hasta abril, con el pico de las lluvias entre enero y marzo, una temporada seca entre mayo y agosto (IGP, 2005b).

El inicio de las lluvias se da de forma gradual, lenta y variable, que ocurre entre los meses de setiembre y diciembre (IGP, 2005b).

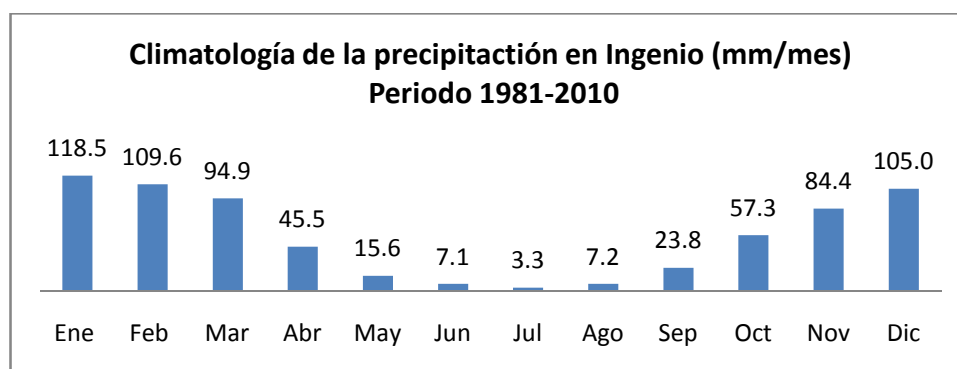
La climatología de las precipitaciones acumuladas evaluadas por el Instituto Geofísico del Perú para el periodo 1964-2002, para la estación de Ingenio ubicada en la zona de estudio (Ver Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Climatología de la temperatura mínima, temperatura máxima y precipitaciones acumuladas de la estación de Ingenio para los meses de Agosto, Setiembre, Octubre y Noviembre (IGP, 2005) (J-J-A: Junio, Julio y Agosto; S-O-N: Setiembre, Octubre y Noviembre); Período 1962-2002.

Mes	Temperatura Mínima (C°)	Temperatura Máxima (C°)	Precipitaciones Acumuladas (mm)
Enero	5.1	19.2	140.8
Febrero	6.3	17.5	131.4
Marzo	6.2	17.7	111.6
Abril	5.1	18.0	48.7
Mayo	2.7	18.8	20.5
Junio	1.1	18.1	8.2
Julio	1.3	17.9	5.2
Agosto	1.2	18.4	9.0
Setiembre	4.4	18.6	29.2
Octubre	5.3	18.9	62.8
Noviembre	5.9	18.6	81.0
DEF	-	-	378
MAM	-	-	188
J-J-A	-	-	22
S-O-N	-	-	173

La estación de Ingenio (75,26 ° Oeste, 11,88 ° Sur a 3 450 msnm) ubicada en el valle del Mantaro, es la estación más cercana a la zona de estudio, presenta una precipitación anual de 672,4 mm; de los cuales casi el 76% precipita en los meses de noviembre a marzo y el 48,1% en el pico de la estación (enero-marzo), siendo enero el más lluvioso (Ver Gráfica N° 4). Esta distribución temporal de las lluvias es similar a lo observado a nivel de todo el valle del Mantaro (Silva et al, 2010).

Gráfica N° 4 Climatología de la precipitación en la estación de Ingenio (Silva y Trasmonte, 2011).

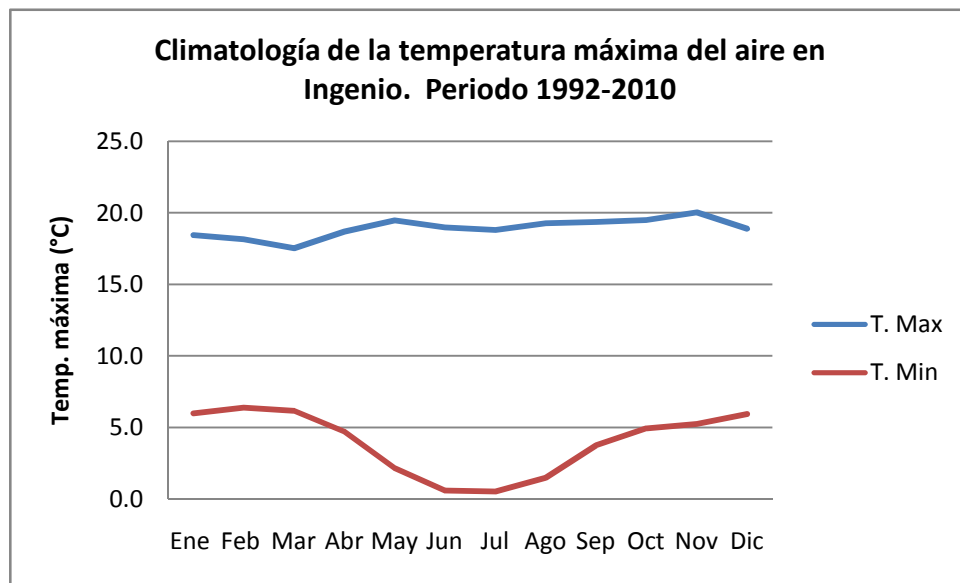


El promedio anual de la temperatura máxima en Ingenio es de 18,9°C y de la mínima es 4°C, sin embargo el rango térmico anual, es decir la diferencia entre el mes más cálido y el más frío puede ser de hasta 19,5°C en promedio (Cuadro N° 2).

El mes donde las temperaturas máximas son más altas es noviembre y donde éstas son más bajas es marzo (Ver Gráfica N° 5) así mismo las temperaturas mínimas del aire experimentan los valores más bajos en los meses de invierno (junio-julio) y en el verano éstas suelen ser más altas (Silva y Trasmonte, 2011b).

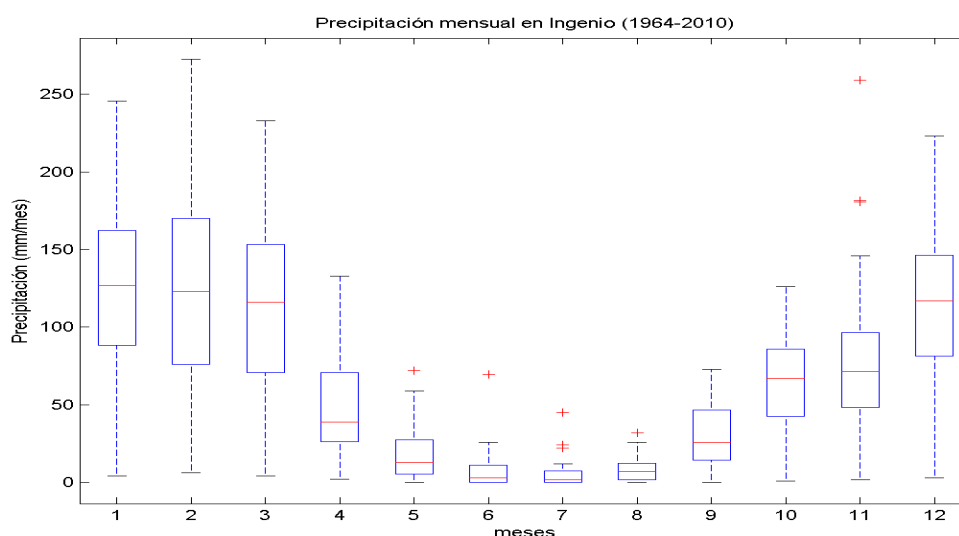
Este comportamiento es común en la sierra peruana, ya que está muy relacionado a la temporada de lluvias y a la presencia de la nubosidad que influye en que las noches sean menos frías y los días no sean tan calurosos durante el verano, debido a la presencia de las nubes (IGP, 2005).

Gráfica N° 5. Climatología de la temperatura máxima y mínima en la Estación de Ingenio



La variabilidad estacional, presentada en las figuras anteriores en promedio nos indica los meses del más o menos lluviosas, más fríos o más cálidos, sin embargo en existe una alta variabilidad interanual, que se representa bastante bien con los diagramas de cajas. En la Gráfica N° 5 nos indica la alta variabilidad que existe en las precipitaciones, principalmente en los meses de máximas lluvias, es decir que algunos años las lluvias han estado muy por debajo de su promedio y otros por el contrario han sido años con exceso de lluvias.

Gráfica N° 6. Diagrama de cajas de la precipitación mensual en la Estación de Ingenio.



Para la cuenca se ha proyectado escenarios climáticos para dos periodos de tiempo en marco de los estudios realizados por el Instituto Geofísico en relación al Cambio Climático (IGP, 2005a) (Ver Cuadro N° 3).

Cuadro 3. Escenarios climáticos para la cuenca del río Mantaro (IGP, 2005a)

Proyección 2055	Proyección 2100
Descripción	Descripción
<ul style="list-style-type: none"> - Entre Enero a Marzo, la temperatura máxima descendería a -3°C, incluso hasta -5°C en la zona oriental. - Entre Enero a Marzo, la temperatura mínima descendería hasta -4°C. - La Precipitación en la cadena occidental central aumentaría en el escenario A1 más del 50%, y en el norte de la cuenca. En el escenario B2, este aumento llegaría más del 100%. - Las precipitaciones se reducirían en un 20% en la región oriental, para el escenario B2. <p>ÁREA DE LA CUENCA: 34,36318 km²</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Las temperaturas máximas se incrementarían a un tasade 0.2°C a 0.28°C por década. - Las temperaturas mínimas se incrementarían de 2.0°C a 3.0°C, sobre todo en el sur de la cuenca. - La precipitación se reduciría en el centro y en el norte, en verano y en invierno. - En invierno no habría variaciones importantes, excepto sobre las 4.000 msnm, en el sector norte de la cuenca, donde se presentaría un reducción de la precipitación de hasta -35%. - En el sur se incrementarían la precipitación en verano y primavera.
Resolución: 20 km	A1B

Dado que las tendencias actuales y los escenarios futuros en la cuenca del Mantaro (IGP, 2005) indican disminución de las precipitaciones y aumento de la temperatura del aire, en

aproximadamente 3% /década y 0,24°C/década, respectivamente, diversos proyectos de adaptación han sido o vienen siendo implementados en esta región, ver Tabla N° 1 (MINAM, 2010).

Tabla N° 1. Resumen de las Actividades en la Cuenca del Mantaro para la Adaptación al Cambio Climático, Modificado: MINAM, 2010.

Proyecto		Nivel de Adaptación			Acciones Complementarias		
CUENCA DEL MANTARO	Ejecutores	<i>Evaluación de vulnerabilidad y propuestas de adaptación</i>	<i>Implementación de medidas de adaptación</i>	<i>Integración de la adaptación en la planificación</i>	<i>Fortalecimiento de capacidades</i>	<i>Investigación y observación sistemática</i>	<i>Educación y comunicación</i>
Investigaciones varias sobre la disponibilidad hídrica en distintas Cuencas	SENAMHI					X	
Implementación de medidas de adaptación (2010-2012)	MINAM, BID		X				
Monitoreo de Glaciares – PRAA (2006-2012)	SENAMHI, MINAM, FMAM		X			X	
Vulnerabilidad al cambio climático de los Ecosistemas Andinos	INIA, UNIVERSIDAD DE CORNELL-USA, BM		X				
PROCLIM - Vulnerabilidad y Adaptación en la Cuenca del río Mantaro	MINAM-IGP	X		X		X	X
Manejo de desastres ante eventos meteorológicos extremos (sequías, heladas y lluvias intensas) como medida de adaptación ante el cambio climático en el valle del Mantaro (MAREMEX-Mantaro)	IGP, IDRC		X			X	
Pronóstico estacional de lluvias y temperaturas en la Cuenca del río Mantaro para su aplicación en la Agricultura	IGP, INCAGRO				X	X	
Fortalecimiento de capacidades para la adaptación al cambio climático en la región Junín (SNIP 75193). Componente 3: Vulnerabilidad y Adaptación	GORE Junín, IGP, SENAMHI				X	X	

2.3 LA ACUICULTURA Y EL CAMBIO CLIMÁTICO.

Se han encontrado dos tipos de efectos del cambio climático sobre la acuicultura: Efectos directos (procesos físicos y fisiológicos) y efectos indirectos (variaciones en el abastecimiento de recursos hidrobiológicos y sus consecuentes problemas de comercio) (Handisyde, 2006; De Silva, 2009).

Los efectos del cambio climático pueden variar desde la elevación del nivel del mar, la elevación de la temperatura, cambios en el comportamiento de las lluvias del monzón, aumento de los eventos climáticos extremos y estrés hídrico; en el caso de la elevación de la temperatura global, tiene un efecto en la elevación de la temperatura del agua, la cual podría alterar el rango óptimo de desarrollo para algunas especies acuáticas; por otro lado la disponibilidad del agua, variaciones del clima como eventos de lluvias extremas y una exacerbada eutrotificación y estratificación de las aguas lénticas (De Silva, 2009).

En el caso de la acuicultura continental los peces son consumidores primarios en la cadena alimenticia, siendo miembros importantes de la cadena trófica en este tipo de ecosistemas. En el caso de la acuicultura marítima se tiene un escenario probable de impacto por parte de eventos extremos meteorológicos (Handisyde, 2006; Marcogliese, 2008; De Silva, 2009).

En el aspecto de la mitigación, el cual comprende la menor emisión de gases de efectos invernadero, la acuicultura emite menos gases de carbono en comparación a otros sistemas de crianza terrestres para la obtención de proteína animal. Cualquier incremento o disminución de la temperatura del hábitat podría tener una influencia significativa sobre el metabolismo general, la tasa de crecimiento y la reproducción (Marcogliese, 2008).

Las temperaturas máximas y mínimas letales con los rangos de temperatura de sobrevivencia difieren en cada especie de peces (Ver Tabla N° 2). Sin embargo, en un escenario de variaciones de temperatura podría alterarse la distribución espacial de las especies acuícolas (WWF, 2005; Handisyde, 2006).

Tabla N° 2 Temperaturas tolerantes para diferentes especies cultivables acuícolas (Modificado de: De Silva, 2009).

Especies	Límite inferior (C°)	Limite Superior (C°)	Rango Optimo (C°)
Tilapia	7	42	28.8 - 31.3
Anguila	0	39	22 - 23
Trucha arcoíris	0	27	9 - 14
Salmon de atlántico	-0.5	25	13 - 17

En el valle del Mantaro se presentan dos tipos de sistemas acuícolas: en pozas o en jaulas (PRODUCE., 2008a; PRODUCE., 2008b). Los factores que más influyen sobre la temperatura de las pozas son la radiación solar, temperatura del aire, velocidad del aire, humedad, turbidez del agua y la morfología de la poza (De Silva, 2009).

La mayoría de los sistemas de cultivos de los salmónidos, especialmente en las truchas, disponen de un alto intercambio del recurso hídrico lo que mitigaría los efectos de elevación de la temperatura global. Sin embargo, la variación de la disponibilidad del agua en los ecosistemas altoandinos, en donde se practican estos tipos de producción de truchas, podría alterar las condiciones de cultivo (Handisyde, 2006; De Silva, 2009).

En el caso de la acuicultura marítima debería tener alta referencia con los eventos de emergencia de enfermedades en Ecuador o en el caso de la producción de Salmónidos en Chile (Sharp, 2003).

En cambio para el caso de las zonas acuícolas continentales debemos tener en cuenta que para los ecosistemas altoandinos se generará un escenario de estrés hídrico que generaría menos intercambio de Oxígeno disuelto en el medio acuático o un aumento de compuestos orgánicos en sistemas lénticos por la elevación de la temperatura (Sharp, 2003; Soto, 2008; De Silva, 2009).

2.3.1 Emergencia de enfermedades en animales acuáticos.

Los efectos del cambio climático sobre los animales ha sido poco explorado por investigadores. Se ha incrementado la incidencia de brotes de enfermedades en corales y en mamíferos acuáticos, conjuntamente con la incidencia de nuevas enfermedades.

El “blanqueamiento” de los corales estuvo relacionado con el evento de El Niño en 1997 y 1998. Este proceso se inicia con la expulsión de la población de algas simbióticas ante factores de estrés en el medio ambiente (Marcogliese, 2008; De Silva, 2009).

Por causa de la variabilidad climática decadal que presentó por el ENSO se generó un brote de *Perkinsus marinus* en ostras (*Crassostrea virginica*). Este brote ocurrió en el Golfo de México donde el ENSO genera una baja en la temperatura del ecosistema del Golfo, en cambio, el proceso complementario que es la Niña genera una mayor temperatura, la cual aumentaría la presencia de *Perkinsus marinus* (Harvell *et al.*, 1999). A la par de los procesos de cambios en los ecosistemas también debemos contemplar los factores antropogénicos que han contribuido en la diseminación de enfermedades. El aumento del comercio global ha aumentado la movilización de especies y por ende, de patógenos (Harvell *et al.*, 1999).

La degradación de los ecosistemas por parte de algunas actividades productivas que facilitarían la emergencia de enfermedades a través de compuestos organoclorados por ejemplo tienen impactos sobre la actividad de células NK, así como también la actividad mitógena y de inducción de células T (Kim *et al.*, 2006; Marcogliese, 2008). En algunas zonas del globo por acciones antropogénicas se ha aumentado la eutrotificación y por ende el aumento de la población de algas en los océanos (Harvell *et al.*; 1999, Harvell *et al.*, 2002) (Ver Tabla N° 3).

Tabla N° 3. Impactos Potenciales del Cambio Climático en los sistemas acuícolas (Modificado de: Handisyde, 2006) (SST: Temperatura superficial del Mar).

Causas de las Alteraciones	Impacto en los sistemas de cultivo	Impactos operacionales
Variaciones en la SST	Aumento de las algas marinas Disminución del O ₂ . Incremento de las enfermedades Aumento de la temporalidad estacional Variaciones en la ubicación y disponibilidad de especies acuícolas	Cambio en las infraestructuras y costos de operaciones. Expansiones y alteraciones de la ubicación geográfica de las especies acuáticas.
Elevación del nivel del mar	Pérdida de áreas para la acuicultura. Pérdida de barreras naturales físicas. Aumento del riesgo de inundaciones. Intrusión de cuerpos de agua salada sobre el continente. Alteraciones en la salinidad del agua.	Daños en la infraestructura. Cambio en la zonificación para el uso de la acuicultura. Aumento de los costos de aseguramiento. Reducción de la disponibilidad de agua dulce.
Sequías y estrés hídrico	Reducción de la calidad del agua Incremento de las enfermedades Incertidumbre en la disposición del agua	Pérdida del stock de animales Conflictos ante el uso del agua Reducción de la productividad Cambios en los tipos de especies

No es difícil determinar el comportamiento de las enfermedades bacterianas en la acuicultura por que en la mayoría de los casos, la incidencia y la persistencia están relacionadas al estrés del pez. El mayor problema actualmente para la acuicultura es la diseminación de enfermedades (Harvell *et al.*; 1999, Harvell *et al.*, 2002).

Uno de los eventos registrados en relación a lo mencionado en el párrafo anterior, se considera a la diseminación de la mancha blanca en camarones en el Ecuador y el más reciente caso de ISA (Anemia infecciosa del Salmon) (Harvell *et al.*; 1999, Harvell *et al.*, 2002).

La influencia del clima sobre los parásitos y las enfermedades de especies importantes pueden surtir efectos en cascada a través de las redes tróficas e influir así en ecosistemas enteros (Marcogliese, 2008).

2.3.2 El sector acuícola como medio de vida sostenible.

El sector acuícola contribuye el medio de vida de millones de personas alrededor del mundo, el incremento del empleo directo para esta actividad se ha dado en las últimas tres décadas con un aumento del 3.6% por año desde 1980. En el 2008, se ha establecido que el mayor porcentaje de los acuicultores se encuentre en Asia (85.5%), seguido de Africa (9.3%), Latinoamérica (2.9%), Europa (1.4%), Norteamérica (0.7%) y Oceanía (0.1%) (FAO, 2009).

El desarrollo rural es el proceso por el cual se da un crecimiento a la economía rural proveyendo de un bienestar para la población. Los sistemas productivos que se encuentran en el territorio se comportan como medios de vida de la población (Sharp, 2003; De Silva, 2009).

Los medios de vida sostenibles están constituidos por las posibilidades, activos y actividades que la población necesita para ganarse la vida y sobrevivir. La teoría de los medios de vida sostenible proporciona un enfoque de los objetivos del desarrollo social y económico centrado en las personas y los pueblos. La acuicultura como medio de vida puede ayudar a aliviar la pobreza, a elevar el grado nutricional de la población y disminuir la producción de monocultivo (De Silva, 2009).

La acuicultura en los inicios de la década de 1970 se estructuró a partir de proyectos de gran escala e infraestructura, desestimando su vocación primigenia para el desarrollo de medios de vida de subsistencia de la población. Paradójicamente este proceso se vio de la mano con un proceso de

desarrollo local de la acuicultura de expansión y de incremento del flujo económico a las zonas rurales (FAO, 2009). En el contexto rural, la acuicultura productiva se complementa con una pesca artesanal. Ante contextos como el incremento de la población, degradación ambiental y limitada captura de peces silvestres, la acuicultura ofrece una alternativa de desarrollo local (FAO, 2009).

En el caso del valle del Mantaro la mayoría de sistemas de producción son de dos tipos: producción de subsistencia y producción a menor escala. El ministerio de la producción (PRODUCE) dentro de su Catastro Acuícola vigente denomina como tipo de desarrollo al nivel de producción que se presenta en la piscigranja. Este puede ir desde mayor escala, productor de semillas, menor escala y de subsistencia. En el caso de modalidad de cultivo se refiere al número diferente de especies que el productor maneja dentro de su piscigranja (PRODUCE, 2008b). Para el caso de la Región de Junín, el tipo de piscigranja que se encuentra más extendida en el valle es la de menor escala y de monocultivo teniendo una presencia muy representativa la crianza de truchas. Las piscigranja son desarrolladas en ecosistemas de ríos y lagunas (PRODUCE, 2008a). En el caso de la amazonia, esto es mucho más resaltante debido a que las especies silvestres son cultivados en los sistemas de producción acuícola. Las alteraciones de los ciclos hidrológicos alterarían los procesos fisiológicos de algunas especies tanto en sistemas lóticos como lénticos. (Ficke, 2007).

La acuicultura aporta a la seguridad alimentaria y no solo a los que manejan directamente con los recursos sino también con los consumidores que demandan un alimento de alto valor proteico. Una porción de 150 gr de pescado ofrece un 50-60% de proteína. Con los peces se ofrece la disponibilidad de micronutrientes, incluyendo varias vitaminas y minerales. Con algunas excepciones los pescados ofrecen grasas insaturadas, carbohidratos y colesterol. Estos aporte sustentan de manera adecuada políticas de seguridad alimentaria en base a la acuicultura (Ficke, 2007).

2.4 El microorganismo.

2.4.1 Características generales.

La *Yersinia ruckeri* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. La bacteria tiene una forma bacilar de terminaciones romas (Davies, 1991b; Coquet *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2003). Aproximadamente tiene una tamaño de 0.75 μm de diámetro y entre 1.0-3.0 μm de largo (Davies, 1991a). Estas bacterias no forman esporas, no poseen capsula y frecuentemente presentan flagelos peritricos. Como los flagelos no siempre están presentes, no siempre presenta motilidad (Davies, 1990; Fernandez *et al.*, 2007a). Las bacterias Gram-negativas de aguas frías principalmente afectan a los estadios juveniles en los peces (Del Cerro *et al.*, 2002).

Yersinia ruckeri es glucosa fermentativo, oxidasa negativo y nitrato negativo. Para la distinción bioquímica de esta especie es β -galactosidasa, lisina descarbolixasa y Ornitina positiva, en donde no se produce H₂S ni índole correspondiente (Fernandez *et al.*, 2007a). *Yersinia ruckeri* además fermenta glucosa, manitol en contraste al inositol, rhamnosa, sucrosa, melibiosa y arabinosa. Basándose en este grupo de bioquímicas se puede establecer una kit como el API 20E system (Cipriano *et al.*, 1986).

La bacteria crece mucho mejor a un rango de temperatura entre 22-25°C que el rango entre 35-37°C. El período de incubación es de 5-10 días. La enfermedad es mas contagiosa a una temperatura entre 15-20°C (Coquet *et al.*, 2002).

El microorganismo ha sido reportado en Australia, Bulgaria, Canadá, Chile, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Irán, Nueva Zelanda, Noruega, Sudáfrica, Portugal, España, Suecia, Suiza, Turquía, Inglaterra, USA, Venezuela (Arias *et al.*, 2007; Wheeler *et al.*, 2009; Wiens, y Vallejo, 2010).

El organismo forma biofilms sobre los estanques de las piscigranja con lo cual se puede presentar una reinfección de esta enfermedad. Se ha demostrado que existe una reacción cruzada con el suero de peces infectados con *Hafnia alvei* (Coquet *et al.*, 2002).

2.4.1.1 Tipificación de microorganismo.

Las cepas de *Yersinia ruckeri* puede ser clasificado bajo los biotipos, serotipos y proteínas de membrana externa (Abbass *et al.*, 2010). En relación al biotipo se dividen a partir de la capacidad de la fermentación del sorbitol y diferencias en la hidrólisis de Tween 20 y Tween 80 con la motilidad (Arias *et al.*, 2007; Gibello *et al.*; 2004). La mayoría de trabajos han establecido su tipificación mediante la reacción serológica; determinándose 6 serovares (LeJeune y Rurangirwa, 2000; Lucangeli *et al.*, 2000; Coquet *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2003, Fernandez *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2007a; Markkula *et al.*, 2007).

La tipificación serológica se realiza a partir de la reacciones que se asocian a los antígenos de la bacteria que contienen al antígeno O, antígenos flagelares (Evenhuis *et al.*, 2009; Wiens y Vallejo, 2010). El serotipo 1 se presenta en la mayoría de los brotes además de ser el más virulento. El serotipo tipo II fue aislado en el Salmon real (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Cipriano *et al.*, 1986). Los serotipos II, III y V presenta la habilidad de fermentar el sorbitol (Cipriano *et al.*, 1986). El

serotipo III fue aislado en Australia y a su vez el serotipo V fue aislado en Colorado, USA (Davies, 1990; Arias *et al.*, 2007).

Los antígenos O presentan 5 tipos de serovares (01, 02, 05, 06 y 07) basado en la estabilidad ante el calor (Anderson *et al.*, 1979; Davies, 1990; Haig *et al.* 2010). En este tipo de clasificación se ha encontrado que el serotipo 01 corresponde al serotipo III que fue aislado en Australia (Davies, 1991a; Davies, 1990).

Una clasificación que armoniza con los criterios anteriores se tiene que el serotipo O1 es dividido en dos sub-grupos O1a (previamente denominado serovar I) y Ob1 (previamente serovar III). Serovar O2 (serovar II) es subdividido en tres subgrupos O2a, O2b, O2c. Los serovares O3 (serovar V) y serovar O4 (serovar VI) también son codificados (Davies, 1991a; Davies, 1990).

2.4.2 Factores de virulencia.

2.4.2.1 Toxinas extracelulares.

Los productos extracelulares producidos por *Y. ruckeri* incluye lipasas, proteasas, haemolisinas, las cuales reproducen algunas de los signos clínicos de la enfermedad como la hemorragia en la boca y en el intestino (Bourne *et al.*, 2009).

En la fase final exponencial de ciclo de la bacteria produce una metaloproteasa de 47-KDa designada Yrp1 (Fernandez *et al.*, 2003). La proteasa es expulsada por parte de la bacteria por medio del sistema de secreción de proteínas ABC compuesto por tres partes de genes: *yrpD*, *yrpE* y *yrpF*, con un inhibidor de proteasa *inh* (Fernandez *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2003). Yrp 1 no es un molécula presente en todos los serovares de *Yersinia ruckeri* (Fernandez *et al.*, 2003). El serovar tipo I presentar mayor actividad proteasa en comparación a las otros serovares (Fernandez *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2003). Yrp1 proteasa contribuye en la virulencia de la bacteria en la colonización e invasión de diferentes tejidos (Ryckaert *et al.* 2010; Dahiya y Stevenson, 2010). La capacidad de la enzima puede degradar una amplia variedad de matrices extracelulares y de proteínas musculares y pueden alterar la morfología de las membranas y la porosidad de los vasos sanguíneos (Fernandez *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2003; Gibello *et al.*, 2004). Esta capacidad genera el signo típico de la hemorragia alrededor de la boca y en el intestino (Fernandez *et al.*, 2002).

La expresión de la proteasa presenta una influencia de las condiciones microambientales. Existe una inhibición en bajas concentraciones de Carbono y Nitrógeno (Wiens y Vallejo, 2010;

Ryckaert *et al.*, 2010; Tobbach *et al.*, 2010a). En el caso de la glucosa y fructosa también son reconocidos como altos inhibidores de la producción de la proteasa, no así para los carbohidratos como el glicerol, manitol y maltosa que no presenta ese efecto represivo (Mendez *et al.*, 2010; Navais *et al.*, 2010). La osmolaridad y la temperatura del medio manifiestan una regulación sobre esta proteasa (Mendez *et al.*, 2010). A una mayor presión osmótica se ha encontrado una disminución de la producción de la proteasa. Se ha encontrado que el Mg^{+2} y Ca^{+2} son co-factores necesarios para el funcionamiento de la proteína (Ryckaert *et al.*, 2010). La hemolisina/citolisina denominada Yhla juegan un papel en la patogenicidad de *Yersinia ruckeri*, esta proteína tiene la capacidad de lisar los eritrocitos (Fernandez *et al.*, 2007b).

2.4.2.2 Adhesinas e invasinas.

Existen tres tipos de adhesinas dentro del género *Yersinia*: invasina, Ail y YadA (Romalde y Toranzo, 1993; Fernandez *et al.*, 2004; Tobbach *et al.*, 2010b). Las adhesinas permiten la internalización de la bacteria en el macrófago así como también como los neutrófilos y células dendríticas (Romalde y Toranzo, 1993). Para el caso de *Yersinia ruckeri* no existe una evidencia científica clara en este punto, aunque se pudo encontrar algunas células dentro de los fagocitos en truchas arcoíris (Welch y Wiens, 2005).

2.4.2.3 Ruckerbactina.

La captación de hierro es muy importante para el proceso de colonización e invasión de la bacteria. La ruckerbactina es un sideroforo de bajo peso molecular quelado con Fe^{+3} (Fernandez *et al.*, 2004). Los sideróforos pueden dividirse en tres tipos: catecolatos, hidroximatos y compuestos heterocíclicos (Fernandez *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2007a). Los sideróforos interactúan con proteínas de la membrana externa de la bacteria, por medio de la cual el metal es ingresado al citosol de la bacteria para que participe en diferentes mecanismos celulares intrabacterianos (Fernandez *et al.*, 2007a). Esta proteína también es influenciada por la temperatura, en condiciones de 18°C se ha descrito una mayor producción en comparación a temperaturas de 28°C. Esto condice con la temperatura idónea para el crecimiento de *Yersinia ruckeri* (Fernandez *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2007a).

2.4.2.4 Plásmidos.

Se ha identificado la presencia de un plásmido largo de 75 mDa en la mayoría de cepas estudiadas de *Yersinia ruckeri* (De Grandis y Stevenson, 1985; Cutrin *et al.*, 1994; Garcia *et al.*,

1998). Este plásmido ha sido encontrado solo en el serotipo O1 (Haig *et al.*, 2010). Plásmidos pequeños han sido observados tanto en el serotipo O1 como en el resto (Beynon *et al.*, 1994). Además existe una plásmido de 70-mDA que forma parte del TTSS, el cual es requerido para contrarrestar la respuesta inmune del hospedero (Gunasena *et al.*, 2003). Un TTSS o un “inyectosoma” consiste en dos anillos abarcando las dos membranas bacterianas (Gunasena *et al.*, 2003). Esto explica porque en el caso de *Yersinia ruckeri* no se encuentra una alteración de su membrana en el momento de verter sus compuestos sobre el hospedador (De Grandis y Stevenson, 1985; García *et al.*, 1998). A esta proteína se le denomina YOP la cual además disminuye su actividad en condiciones de baja concentración de Ca^{+2} (Tobback *et al.*, 2010a).

2.4.2.5 Sistema de secreción de tipo III.

El TTSS ha sido descrito en todas las especies de *Yersinia* de impacto sobre la salud pública, así como también en el caso de *Yersinia ruckeri* (Gunasena *et al.*, 2003). Secuencias analizadas han encontrado genes con una significativa homología en los cromosomas codificados para YSA TTSS por los genes de *Y. enterocolitica* biovar 1B (Davies, 1990; Beynon *et al.*, 1994; Gunasena *et al.*, 2003; Fouz *et al.*, 2006). Esto sugiere que este tipo de sistema de secreción también se encuentra en *Yersinia ruckeri* (Gunasena *et al.*, 2003). Este tipo de mecanismos de secreción contribuye con los estadios gastrointestinales mediante la liberación de proteínas efectoras denominadas Ysps (Gunasena *et al.*, 2003).

2.4.2.6 Sistema de secreción de tipo IV.

Se han encontrado 8 genes en *Yersinia ruckeri* que serían parte del sistema de secreción IV (Gunasena *et al.*, 2003, Wiens y Vallejo, 2010). Similar a los patógenos intracelulares que presentan el TFSS se les ha identificado en la participación en la transferencia de diferentes moléculas efectoras dentro de las células del hospedero la cual participan en la sobrevivencia dentro de los macrófagos y de los glóbulos rojos (Romalde y Toranzo, 1993; Ryckaert *et al.*, 2010).

2.5 La enfermedad.

2.5.1 Hospedero.

La bacteria *Yersinia ruckeri* fue inicialmente aislada en un cultivo de truchas arcoíris (Ross *et al.*, 1966; Rucker, 1966); pero ha sido aislado en el salmón coho (*Oncorhynchus kitush*), salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), trucha degollada (*Salmon*

clarki), salmón del atlántico (*Salmon salar*), trucha marrón (*Salmon trutta*), trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) y la trucha de manantial (Tobback *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2007).

Para el caso de los peces no salmónidos se ha encontrado en el esturión siberiano (*Acipenser baeri*), anguila común (*Anguilla anguilla*), carpa cabezona (*Aristichthys nobilis*), goldfish (*Carassius auratus*), Cisco (*Coregonus artedii*), coregano peled (*Coregonus peled*), carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), pez gato americano (*Ictalurus punctatus*), burbot (*Lota lota*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y lenguado común (*Solea solea*). Además se ha aislado en rata almizquera (*Ondatra zibethica*) y lombriz de humus (*Eisenia foetida*) (Fouz *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2009).

Yersinia ruckeri ha generado un cuadro de enfermedad principalmente en los salmónidos; pero, también se ha observado en el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*), esturión siberiano (*Acipenser baer*) y el goldfish (*Carassius auratus*) (OIE, 2006a). *Yersinia ruckeri* afecta tanto a los salmónidos de agua continentales como los salmónidos de agua salada (Tobback *et al.*, 2007).

2.5.1.1 Patogénesis.

Yersinia ruckeri pertenece a la familia *Yersiniaceae* en donde se encuentra tres especies de *Yersinias* causantes de enfermedades en humanos: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* (Arias *et al.*, 2007; Concha 1998).

La diseminación de *Yersinia ruckeri* ocurre entre peces con el contacto directo con un animal infectado o portador. Se ha determinado que dentro de una población de truchas arcoíris más del 25% posee al agente en la parte posterior del intestino delgado (Romalde y Toranzo, 1993; Ryckaert *et al.*, 2010).

La vía de ingreso que se ha certificado es el tejido branquial. Se ha encontrado dentro de las dos primeras horas de infección por *Yersinia ruckeri* la mayor población de la bacteria se encuentra en el mucus branquial, desde donde se desplazaría al tejido vascular branquial, en donde se iniciaría el proceso septicémico de la bacteria (Neumann y Tripp, 1986, Tobback *et al.*, 2009). Otros agentes patógenos septicémicos como *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* también presenta esta vía de entrada de infección (Soto, 2008).

Para el caso de la respiración, las branquias presentan un largo número de capilares vasculares; sin embargo, éstas estructuras pueden servir de entradas idóneas para bacterias y facilitar la diseminación hacia todo el cuerpo de los peces (Tobback *et al.*, 2009).

Yersinia ruckeri también tiene la capacidad de adherirse a otras superficies corporales del individuo en donde se ha encontrado una cantidad considerable tanto en intestino como en la piel inmediatamente después de la infección (Tobback *et al.*, 2010b).

La eliminación intestinal de *Yersinia ruckeri* permite la recurrencia de la infección y mortalidad en la población afectada. La infección mediante individuos portadores presenta un papel importante bajo condiciones de estrés (Capkin y Altinok, 2009). Luego de dos meses de presentarse un brote de *Yersinia ruckeri* se ha podido aislar el agente de las heces de los peces (Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010b).

Si ya se ha manifestado *Yersinia ruckeri* en el lugar de estudio y acontece un factor de estrés ambiental o disminuye la calidad del agua, la sintomatología o la mortalidad de los peces aparece a los 3-5 días post-infección y si no se ha reportado la presencia de *Yersinia ruckeri*, el agente bacteriano se presentaría 3-7 días post-infección (Hamdi Avci, 2005).

Se ha determinado que *Yersinia ruckeri* tiene la habilidad de formar biofilms sobre diferentes tipos de soportes sólidos. La sobreexpresión de antígenos flagelares es una de las características fenotípicas que participaría activamente en la eficiencia del proceso de adhesión (Coquet *et al.*, 2002).

Estos biofilms podría ser fuente de la reinfección en piscigranjas de truchas arcoíris. La transmisión de *Yersinia ruckeri* también se ha demostrado mediante invertebrados acuáticos y aves (Coquet *et al.*, 2002).

No se ha determinado la transmisión vertical para el caso de *Yersinia ruckeri*; pero, se ha encontrado el agente en ovas no fertilizadas de Salmon Chinook con una escasa mortalidad a las 12 semanas de ser alimentados (Coquet *et al.*, 2002).

El estado de salud de los peces establece una fuerte relación con la geomorfología, limnología e hidrología del medio acuático en donde se encuentran los animales (Hedrick, 1998). La mayoría de enfermedades bacterianas que se presentan en los peces son causadas por bacterias que generalmente forman parte de su microbiota o del medio ambiente acuático, los patógenos son facultativos u oportunistas, lo que se considera un factor de riesgo en la sanidad en los sistemas acuícolas (Rubio, 2010).

2.5.1.2 Respuesta inmune de los peces.

Los peces fueron los primeros vertebrados que presentaron un sistema inmune completo hace 450-500 millones de años (Raida y Buchmann, 2009). Los peces son ectodermos, lo que hace que estén sujetos a los cambios de la temperatura conlleva que la respuesta inmune adaptativa sea lenta y escasa, por ello, la respuesta innata cobra una importancia dentro de la respuesta inmune del pez (Mydlarz *et al.*, 2009).

La respuesta de los peces inicia con la reacción contra las moléculas de reconocimiento asociadas a los patógenos (PAMPs) que no son usualmente encontradas en células eucariotas como las moléculas de ARN viral de doble cadena, lipopolisacáridos bacterianos y ciertos azúcares (Davies, 1991b).

El sistema inmune depende de factores ambientales (salinidad, temperatura, fotoperíodo) y estado fisiológico (nutrición, edad, ciclo reproductivo, balance hormonal y estrés) (Cossarini-Dunier *et al.*, 1988; Buchmann *et al.*, 2003; Raida y Buchmann, 2009).

2.5.1.3 Signos clínicos.

Se ha encontrado en animales infectados por vía intraperitoneal que presentaron la forma aguda de la enfermedad; cuadros de hiperemia y hemorragia en la base de las aletas dorsales, ventrales y anal; además, alrededor del ano y ojos, sobre la vejiga natatoria y en las branquias, acompañados de cuadros de hepatomegalia y esplenomegalia (Hamdi, 2005).

Los individuos en el estanque presentan una conducta letárgica y dificultades en el nado, además se encuentran muy cercanos a la superficie del cuerpo de agua (Fouz *et al.*, 2006). Animales con cuadros crónicos evidenciaron melanosis y una decoloración grisácea del hígado (Vladik y Prouza, 1990; Raida *et al.*, 2003; Raida y Buchmann, 2008); además, se observó un oscurecimiento y una disminución del tamaño del riñón y bazo (Buchmann *et al.*, 2003).

También se encontró algunas hemorragias petequiales sobre la superficie del estómago y dentro del músculo lateral (Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010b). En el estómago y ciegos pilóricos presentaban un contenido mucoso claro y en algunos animales se encontró intestinos de consistencia flácida y contenido acuoso rojizo (Arias *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2010a).

En el caso de la presentación crónica se ha encontrado una pérdida del apetito y letargia; además, despigmentación o melanosis, palidez de las agallas y exoftalmia (Lucangeli *et al.*, 2000; Altinok *et al.*, 2001). La exoftalmia por lo general se acompaña de una hemorragia alrededor de la cavidad oral y en el hígado se observó un ligero aumento del tamaño y una decolorización amarillo-grisácea notoria (Stevenson y Airdrie, 1984; Cipriano *et al.*, 1986).

Tanto el estómago, ciegos pilóricos y el intestino tenían un engrosamiento de la mucosa con un fluido amarillento (Stevenson y Airdrie, 1984; Cipriano *et al.*, 1986). Los riñones y el bazo presentaban una disminución del tamaño y un oscurecimiento de los tejidos (Stevenson y Airdrie, 1984; Cipriano *et al.*, 1986).

2.5.1.4 Hallazgos histopatológicos

En la forma aguda se presenta edema, hiperemia y descamación de las células epiteliales en las lamelas secundarias y lamelas primarias (Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009). En las lamelas secundarias, descamación de células epiteliales lamelares (Tobback *et al.*, 2007); además, se ha observado una dilatación capilar en las lamelas secundarias y una hemorragia difusa tanto las lamelas primarias como secundarias (Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2007).

En el caso del tejido renal son poco los cambios en los túbulos renales. Sin embargo se observó en algunos animales una proliferación de las células mesangiales. En los riñones se observó una disminución de las células linfoides. En el bazo, se denota como principal lesión percibida es la necrosis focal (Tobback *et al.*, 2009).

En la presentación crónica hiperplasia de las células interlamelares y lamelas primarias; además, se observó tanto en los animales infectados como los animales controles la alteración de las células interlamelares (Tobback *et al.*, 2009). Esto pueda deberse a la calidad del agua que se presentaba en el estudio. No se reportado en otro estudio este tipo de alteración (Tobback *et al.*, 2007).

En el tejido hepático, evidenciaron vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos (Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010a; Tobback *et al.*, 2010b). Se ha observado diferentes tipos degeneraciones grasas en donde los hepatocitos se han vuelto pequeños y han desaparecido los espacios sinusoidales. En el riñón, se ha observado proliferación de células mononucleares con una ligera alteración del núcleo en los tejidos hematopoyéticos (Tobback *et al.*, 2009).

En el caso de los melanomacrófagos se ha demostrado que el aumento de ellos en el tejido renal podría estar reflejando un proceso de respuesta inflamatoria crónica causando cuadros de nefritis crónica (Tobback *et al.*, 2009).

2.5.2 Medio ambiente

La mortalidad por causa de *Yersinia ruckeri* ha disminuido por causa de la elevación en el nivel de la salinidad del medio acuático, debido que el medio hiperosmótico reduce la adhesión bacteriana sobre los tejidos del pez (Thorsen *et al.*, 1992).

La infección por *Yersinia ruckeri* se presenta por general en cuadros hiperagudos y agudos, especialmente en animales jóvenes cuando existe un brusco aumento de la temperatura del agua en la primera; en cambio, las infecciones crónicas aparecen en la época de invierno (Bomo *et al.*, 2004).

Se observó tanto en los animales infectados como los animales controles la alteración de las células interlamelares. Esto pueda deberse a la calidad del agua que se presentaba en el estudio (Bomo *et al.*, 2004).

Para el caso de la temperatura, las truchas arcoíris no presentaron una diferencia significativamente estadística en dos subpoblaciones enfrentadas a *Yersinia ruckeri*: 16°C y 20°C (Fernandez *et al.*, 2003).

La adaptación en medios hiperosmóticos ha sido ampliamente estudiada para el caso de los salmónidos. Se ha encontrado para el caso de truchas arcoíris una disminución de los títulos de anticuerpos contra *Yersinia ruckeri* después de 7 días transferidos de agua dulce a un medio de 22 ppt de salinidad (Thorsen *et al.*, 1992).

En otro estudio, no varió la circulación de anticuerpos específicos de IgM después de 3 días de ser trasladadas desde agua dulce a un medio de 12 ppt de salinidad; pero, si se denotó una disminución de la actividad de las lisozimas (Romalde y Toranzo, 1993; Tobback *et al.*, 2009).

Respecto a la toxicidad del nitrito, se encuentra una diferencia en los peces según el tamaño del individuo. Para el caso de truchas arcoíris se encontró una mayor LD50% en animales pequeños más que en los individuos adultos (Hebert *et al.*, 2008). Además se ha observado una relación inversamente proporcional entre la toxicidad del nitrito con el pH del medio acuático. En general, los

salmónidos tiene un escaso umbral muy sensible ante el nitrito; en el caso de trucha, se ha observado valores entre 0.2-0.3 mg/L para LC50% (Raida y Buchmann, 2007).

2.5.3 Epidemiología.

La dinámica de las enfermedades en medios acuáticos presenta la misma triada de interacción entre el hospedero, el agente y el medio ambiente. Con respecto al factor medio ambiental, en los sistemas acuáticos cobran mucho más relevancia los posibles efectos tanto el hospedero como en el agente (Hedrick, 1998). Para el caso de *Yersinia ruckeri* se ha encontrado una transmisión horizontal entre los individuos (Ögüt K, 2005).

Yersinia ruckeri puede presentar animales portadores que actúan como diseminadores de forma latente; pero de lenta transmisión la enfermedad (Coquet *et al.*, 2002; Hamdi *et al.*, 2005; Rakocy, 2005). Según la OIE (2009a) una enfermedad de transmisión lenta presenta una prevalencia entre 1-5% colectándose sesenta (60) animales por muestreo. Para el caso de la piscigranja de estudio se ha determinado la presencia de *Yersinia ruckeri* (N. Sandoval, datos no publicados).

2.5.4 Diagnóstico.

Yersinia ruckeri tiene la capacidad de adherirse en el mucus branquial, aunque en el tiempo, la presencia de la bacteria va disminuyendo (Noga *et al.*, 1988).

Para el caso del diagnóstico se han encontrado métodos no invasivos como la valoración de fluidos de excreción o sangre; pero, los patógenos no son fácilmente aislados en estas metodologías (OIE, 2006a). A razón de la consistencia del tejido renal en el caso de los peces, el cual tiene el aspecto de la medula ósea como el caso de los mamíferos, se realiza una aspiración del tejido. Se tiene que realizar el ingreso por medio del último arco branquial en una dirección dorso-caudal (Noga *et al.*, 1988). Para cada aspiración realizada se tiene que confirmar mediante un análisis microscópico de la presencia de melanocitos, células características del tejido renal (Noga *et al.*, 1988). La especificidad y la sensibilidad que se encontraron fueron de 93 % y 88 %, respectivamente en relación al cultivo de tejido renal obtenido mediante un proceso de necropsia (Noga *et al.*, 1988).

Para el caso del cultivo bacteriano de *Yersinia ruckeri* se utiliza rutinariamente para el cultivo primario los medios de cultivo como BHIA y TSA (Starliper, 2008). El medio diferencial para *Yersinia ruckeri* es el medio SW (Shotts-Walman) en el cual se destaca su capacidad de tener

una especificidad sobre *Yersinia ruckeri* a través de la hidrólisis del compuesto Tween 80 y la reacción negativa ante el manitol (Starliper, 2008). En el cultivo las colonias positivas tienen que verse verdes (la reacción positiva ante el manitol es por medio del azul de bromotimol) con un halo de precipitación (indicando la hidrólisis del Tween 80 con cloruro de sodio) adyacente a la colonia (Furones *et al.*, 1993; Starliper, 2008).

El inconveniente de utilizar este medio es su alta sensibilidad al cambio de pH, debido a esto a la reacción que puede presentar el Tween 80 (Starliper, 2008).

Existe otro cultivo diferencial y selectivo denominado ROD (Ribosa-ornitina-desoxicolato) (Furones *et al.*, 1993). Las colonias se observaron de color amarillo en un medio de cultivo rojo con depósitos amarillos (dexosicolato de sodio) alrededor de las colonias (Starliper, 2008). El medio ROD también tiene un indicador de sulfuro de hidrógeno (*Yersinia ruckeri* no produce sulfuro de hidrógeno) y dodecilsulfato de sodio con dexosicolato de sodio como elementos antibacterianos del medio (Furones *et al.*, 1993; Starliper, 2008).

Todos los medios de cultivo bacteriano para *Yersinia ruckeri* tienen un rango de 20-25 °C para su crecimiento (Furones *et al.*, 1993; Starliper, 2008).

Para el diagnóstico de *Yersinia ruckeri* no es recomendable utilizar los sistemas API. Se encontró que la bacteria diagnosticada como *Yersinia ruckeri*; mediante una prueba, en realidad era la bacteria *Hafnia alvei* (Austin *et al.*, 2003, Romalde, 1991). Esta metodología no es recomendada en el Manual de Diagnóstico para Organismos Acuáticos (OIE, 2006a).

En el diagnóstico por medio de técnicas moleculares se ha utilizado la técnica de PCR múltiple, en la cual se ha encontrado una alta sensibilidad y especificidad pudiendo detectar a las bacterias en concentraciones de 6, 0.6 y 27 UFC para *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophylum* y *Yersinia ruckeri*, respectivamente (Del Cerro *et al.*, 2002).

2.5.5 Control y Prevención

Se han estudiado el uso de probióticos para el caso de *Yersinia ruckeri*; utilizando cepas de *Enterobacter cloacae* y *Bacillus mojavensis*, las cuales han generado un efecto antagónico (Raida *et al.*, 2003; Capkin y Altinok, 2009).

Ante infecciones por *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Aeromona salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio ordalli* se ha utilizado *Aeromonas sobria* y *Bacillus subtilis* como medida de control en truchas pueden controlar enfermedades (Capkin y Altinok, 2009).

De otro lado se ha observado que la administración de células formalizadas o inactivadas por efecto del calor generan una protección baja en truchas arcoíris (*Oncorhynchus rainbow*) y la dorada (*Sparus aurata*) en el uso de vacunas con cepas de *Yersinia ruckeri* (Abbass, 2010).

Los antibióticos que usan en acuicultura son administrados mediante los alimentos o diluidos en el agua en donde se encuentra los especímenes (Abbass, 2010); sin embargo, este tipo de tratamiento puede hacer una presión negativa sobre el ecosistema con la confluencia de mantener una saludable microbiota ambiental (Wagle *et al.*, 1983; Stock *et al.*, 2002). Los dos típicos antibióticos utilizados en la acuicultura son la oxitetraciclina y la sulfametazina ante el caso de furunculosis y enfermedades causadas por pseudomonas (Mammeri *et al.*, 2006).

Para el caso de *Yersinia ruckeri* se han usado individual o combinadamente estos dos fármacos. En algunos brotes de enfermedad no han reaccionado positivamente ante el tratamiento sugiriendo la resistencia antes estos antibióticos (Wiens *et al.*, 2006; Wiens y Vallejo, 2010). Otros fármacos como la sulfonamida, tiamulina y ácido oxolinico han demostrado efectividad en aplicaciones in vivo (Capkin y Altinok, 2009, Stock *et al.*, 2002).

Las diferencias entre los serovares de *Yersinia ruckeri* no demostraron una diferencia significativa en su reacción ante evaluaciones contra antibióticos. Para el caso de polimicina-B si se ha encontrado una diferencia para los diferentes serovares de *Yersinia ruckeri*. Los Serovares II, III y V son altamente resistentes; en cambio, el serovar I es susceptible (Capkin y Altinok, 2009).

Para la administración de antibióticos la dosificación oral se recomienda en el cultivo de peces; pero, el inconveniente de este procedimiento es que no permite un adecuado monitoreo de la dosificación por animal ante la situación en que algunos animales podría recibir una sub-dosificación en relación a la cantidad de alimento ingerido (Stock *et al.*, 2002).

Se ha encontrado que *Yersinia ruckeri* que tiene una natural sensibilidad ante los β -lactámicos, incluyendo amoxicilina y cefalosporina a razón de la ausencia de la presencia de la β -lactamasas o la expresión escasa de la misma (Stock *et al.*, 2002, Capkin y Altinok, 2009).

En relación a la clasificación respecto a la reacción positiva ante el sorbitol, se han determinados dos tipos de cepas: Serotipo 1 y Serotipo 2. El Serotipo 1 genera una intensa manifestación de la enfermedad, en cambio, para el serotipo 2 se presentan las infecciones asintomáticas. La mayoría de las vacunas comerciales solo presentan la cepa de Serotipo 1 (Furones *et al.*, 1990; Beynon *et al.*, 1994; Wheeler *et al.*, 2009).

Se ha demostrado en un ensayo in vitro que se puede eliminar de las células epiteliales branquiales la presencia de *Yersinia ruckeri* mediante una exposición a formalina al tejido branquial. A su vez, también se ha eliminado de las células branquiales del Salmon Atlántico después de un baño de inmunización (Tobback *et al.*, 2009) La estimulación de protección específica en peces mediante técnicas de inmunización no ha obtenido una efectividad esperada. Las técnicas de inmunización de inmersión o de inyección intraperitoneal conllevan a un contexto de estrés generando consecuencias negativas metabólicas (Siwicki *et al.*, 2001).

En el uso de antibióticos se considera a la oxitetraciclina, ácido oxolínico y sulfametazina idóneos para tratamiento de la enfermedad, los cuales pueden controlar el problema, pero su uso a la vez causa una serie de desventajas, tales como desarrollo de resistencia bacteriana, recurrencia de nuevos brotes y altos costos (Concha, 1998). Los errores más comunes detectados que predisponen a la aparición de cepas resistentes se refieren a los siguientes aspectos: tratamientos no avalados por pruebas de sensibilidad, bajas dosis, interrupción o disminución del tiempo mínimo recomendado, errores de cálculo, uso reiterativo de un solo antibiótico (Concha, 1998).

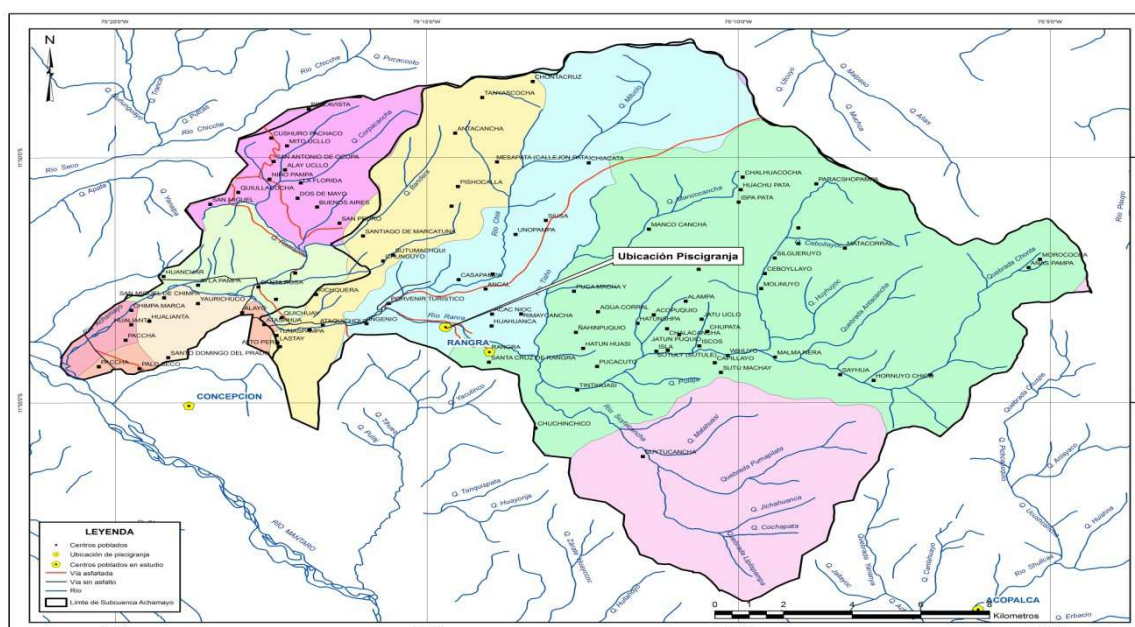
II MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.1.1 Lugar de Muestreo.

La ubicación geográfica de la piscigranja “El Edén” ($13^{\circ}31'33''$ Sur; $71^{\circ}58'53''$ Oeste y a una altitud de 3806.77 msnm) es en el Departamento de Junín, provincia de Huancayo, distrito de Ingenio, subcuenca del río Achamayo. El río Rangras es la fuente del recurso hídrico para la piscigranja de estudio; este último, conjuntamente con el río Chía forma la subcuenca del río Achamayo. El río Achamayo es parte de la cuenca del río Mantaro (ver Gráfica N° 4).

Gráfica 4. Mapa de ubicación de la piscigranja “El Edén”



3.1.1.1 Piscigranja de estudio.

Se tomará una piscigranja que cumpla con los siguientes requisitos:

- Recurso hídrico: El recurso debería de provenir directamente del río Rangras.
- Nivel de producción: La piscigranja de estudio debe de producir menos de 50 Tm, la cual la caracteriza como una producción de menor escala (Produce, 2008a).

La piscigranja “El Edén” pertenece a la Asociación de Piscicultores de la Región Centro (APIREC); la cual, cumplió con estos requisitos.

3.1.2 Tamaño de muestra.

Para el estudio se tomó un total 180 animales divididos equitativamente para cada uno de los tres días de muestreo del trabajo.

3.1.3 Parámetros de inclusión.

3.1.3.1 Muestra biológica.

Cada pez recolectado deberán cumplir con las siguientes características:

- Parámetros biométricos: Los peces evaluados se encontraron en su estadio de juvenil en su ciclo de vida (10-18 cm y 20-80 gr.).
- Procedencia de los individuos: Todas las muestras provinieron de una misma población de un estanque.
- Recolección de los individuos: Se aplicó un muestreo aleatorio simple de uno de los estanques de truchas juveniles. Dentro de la población del estanque elegido al azar se aplicó nuevamente un muestreo aleatorio simple de una muestra de 60 animales por etapa de muestreo.

3.1.3.2 Periodo de muestreo

Para el periodo de muestreo se tuvo como criterio la climatología reflejada por la estación de Ingenio.

Para lo cual, el estudio consideró tres etapas para desarrollar el muestreo, teniendo el siguiente cronograma:

- 1era etapa del muestreo: en el mes de Agosto, que represento a la época de estiaje.

- 2da etapa del muestreo: en el mes de Setiembre, que representó el periodo de tiempo entre el fin de la época de estiaje y el inicio de la época de lluvias.
- 3era etapa del muestreo: en el mes de Noviembre, que represento el inicio de la época de lluvias. Este etapa de muestro se realizó siete (07) días después de iniciada la primera lluvia de la estación, concordando con las observaciones en relación a la *Y. ruckeri* expuestos por Hamdi *et al.* en el año 2005.

Para identificar el inicio de la temporada de lluvias, para el caso de la cuenca del rio Mantaro, se tomó la alerta meteorológica emitida por el SENAMHI como señal para el inicio de la temporada de lluvias moderadas a fuertes. El inicio de la temporada se puede dar en el mes de Octubre o Noviembre (IGP, 2005).

3.2 Metodología de Evaluación y Análisis de los datos.

3.2.1 Toma de Muestras.

Las necropsias fueron realizadas en la piscigranja y se procedió con el siguiente procedimiento para cada uno de los diagnósticos realizados:

- Diagnóstico Histopatológico: se tomaron muestras de riñón, bazo, intestino delgado, branquias, estomago, ciego pilórico e hígado. Los tejidos muestreados tenían una dimensión de 2mm x 2mm. Los tejidos fueron conservados en un medio de formol al 10%.
- Diagnóstico Bacteriológico: se realizó un pequeño piquete sobre el tejido renal y tejido esplénico, en donde mediante un hisopado, se colectaron las muestras. Para el caso del intestino delgado, se procedió a hacer un hisopado directo en el lumen del mencionado tejido. El medio de transporte Stuart (Merck) fue utilizado para las muestras bacteriológicas de los tejidos; además, estas muestras fueron mantenidas en refrigeración e inmediatamente procesadas a su llegada al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La batería de pruebas bioquímicas nos determinará el género de *Yersinia spp* (Romalde, 1991; Austin *et al.*, 2003; Furones *et al* 2004; Starliper, 2008).
- Diagnóstico Molecular: se tomaron muestras de riñón y bazo, las que fueron procesadas juntas mediante la técnica de machacado clásico utilizando un molinillo de vidrio para triturar tejido (tissue grinder) estéril y suero fisiológico logrando una suspensión de

aproximadamente 20% obteniendo 2ml de sobrenadante por muestra y alicuotado en 2 viales. Los viales fueron rotulados y almacenados en congelación a -35°C hasta su utilización.

3.2.1 Métodos de Diagnóstico.

3.2.1.1 Datos biológicos.

Todas las muestras fueron evaluadas por medio de un diagnóstico histopatológico, cultivo bacteriano y PCR. Además se realizó una evaluación Físico-Química del agua. A continuación, pasaremos a explicar cada uno de ellos:

3.2.1.1.1 Diagnóstico Histopatológico.

Se tomaron 60 animales por etapa de muestreo en donde se recolectaron muestra de branquias, parte posterior de intestino delgado, bazo, hígado, riñón, ciegos pilóricos y estomago para determinar la presencia de una bacteria Gram-negativa en la muestra. Además, se verificó si las lesiones son compatibles por una infección de *Yersinia Ruckeri* (Hamdi *et al.*, 2005).

Para la evaluación de los tejidos se consideraron cuatro tipos de lesiones histopatológicas: inflamatorias, adaptativas, degenerativas y la presencia de células eosinofílicas (Palomino, 2008).

A su vez, se consideró 4 tipos de grados para el diagnóstico histopatológico: Grado 1 o escaso, Grado 2 o Leve, Grado 3 o Moderado y Grado 4 o Severo (Palomino, 2008).

3.2.1.1.2 Diagnóstico Bacteriológico.

Se tomó 540 hisopados de la parte posterior del intestino delgado, riñón y bazo. El medio de cultivo a utilizado fue el medio Tripticasa soya (Coquet *et al.*, 2002). Las muestras cultivadas positivas presentaron una colonia de apariencia cremosa, circular de color blanquecina. Luego estas colonias fueron evaluadas por medio de una batería de pruebas bioquímicas que comprenden: LIA, SIM, Rojo de metilo, Oxidasa, Catalasa, Indol, Ornitina (Ewing *et al.*, 1978) para su identificación bioquímica.

3.2.1.1.3 Diagnóstico Molecular

Las colonias sugerentes a *Yersinia ruckeri*, mediante el resultado de diagnóstico bacteriológico, estableció que colonias o tejidos tenían que ser evaluados mediante la prueba de PCR múltiple estandarizada. Esta prueba fue realizada por el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM.

3.2.1.1.4 Evaluación Físico-Química del agua

Se tomaron muestras de agua del estanque en donde se encuentra la población de truchas evaluadas el día en que se realizaron los muestreos. Esta prueba fue realizada por el Laboratorio de Servicios Analíticos Generales SAG. En ella se evaluaron los parámetros de pH, amoníaco, oxígeno disuelto, nitritos, nitratos, nitrógeno amoniacal y sólidos suspendidos totales.

3.2.1.2 Datos climáticos

Los datos climáticos fueron obtenidos de la estación Ingenio (75,26 ° Oeste, 11,88 ° Sur y 3 450 msnm) ubicada en la subcuenca del río Achamayo. Esta estación pertenece al SENAMHI. Las variables analizadas fueron: precipitación diaria, temperatura mínima y máxima del aire para el periodo agosto-noviembre de 2010. Adicionalmente, se calculó el rango térmico diurno como la diferencia entre la temperatura máxima y mínima diaria.

3.2.2 Análisis de los Datos.

Se consideró evaluar la relación de asociación entre el diagnóstico positivo y negativo entre la presencia de lesiones y/o alteraciones en los tejidos evaluados.

Para determinar una muestra de “resultado positivo” se consideró que cumpliera el resultado positivo para el diagnóstico molecular y/o para el diagnóstico bacteriológico. Las muestras analizadas de “resultado negativa” presentaron un diagnóstico negativo tanto para el diagnóstico molecular y el diagnóstico bacteriológico o solo con un resultado negativo para el diagnóstico molecular (ver Cuadro N° 4).

Cuadro 4. Criterios para determinar la presencia de *Yersinia ruckeri* en base a los resultados del diagnóstico molecular y bacteriológico.

Resultado de Diagnóstico	Diagnóstico Molecular	Diagnóstico Bacteriológico
DIAGNÓSTICO POSITIVO Presencia de <i>Yersinia ruckeri</i>	Positivo	Positivo
	Positivo	Negativo
	Negativo	Positivo
DIAGNÓSTICO NEGATIVO Ausencia de <i>Yersinia ruckeri</i>	Negativo	Negativo

Para el caso del diagnóstico histopatológico se consideró el grado y el tipo de lesión que afectaba al tejido. Para el procesamiento de datos se ajustó la variable y se consideró como a todos los grados y a todos los tipos de lesiones para evaluarlas frente a los resultados de positivo y negativo de las muestras analizadas.

Las variables que serán consideradas para determinar si existe asociación entre las lesiones histopatológicas y la presencia de *Yersinia ruckeri* según el momento de muestreo en que se realizó la colecta: en la época seca y en los inicios de la época de lluvias en la piscigranja de estudio (ver Cuadro N° 5).

Cuadro 5. Tipos de variables a analizar para el estudio

Diagnóstico Histopatológico	Sin Lesiones Con Lesiones	Cualitativa binaria	Positivo = 1 Negativo = 0
Diagnóstico Positivo	Muestras con Diagnóstico bacteriológico y/o Diagnóstico Molecular positivo para <i>Yersinia ruckeri</i> colonias aisladas o en tejidos	Cualitativa binaria	Positivo = 1 Negativo = 0
Diagnóstico Negativo	Muestras con Diagnóstico Bacteriológico y Diagnóstico Molecular negativo para <i>Yersinia ruckeri</i> en colonias aisladas o tejidos	Cualitativa binaria	Positivo = 1 Negativo = 0

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Chi ² para determinar la asociación entre el resultado del diagnóstico y las lesiones histopatológicas descritas para cada uno de los meses que se ha desarrollado el trabajo de investigación.

IV. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS METEOROLÓGICO

4.1.1 Precipitación Pluvial

Las precipitaciones fueron registradas por la estación meteorológica de Ingenio del SENAMHI. En los datos evaluados, se observó un aumento en el acumulado de las precipitaciones para el mes de octubre, en relación a los meses anteriores. Los valores encontrados para las precipitaciones diarias de octubre y noviembre presentaron menores diferencias entre los valores de sus respectivos meses (Ver Tabla N° 4).

Tabla N° 4. Registro de las precipitaciones desde el mes Agosto hasta el mes de Noviembre de la estación de meteorológica de Ingenio (SENAMHI, 2010).

Mes	Días evaluados	Media (mm)	Acumulado de Precipitación (mm)	DE	Valor min (mm)	Valor max (mm)
Agosto	31	0.90	2.8	1.03	0	2.8
Setiembre	30	0.29	8.7	1.54	0	3,8
Octubre	31	1.99	61.6	2.52	0	9.1
Noviembre	30	1.83	54.8	3.18	0	11.5
Total	122	1.05	127.9	2.24	0	11.5

[DE= desviación estándar ; Valor min= Valor mínimo mensual; Valor max= Valor máximo mensual]

4.1.2 Temperaturas

Las temperaturas máximas fueron registradas por la estación meteorológica de Ingenio. En los datos evaluados, los valores mínimos registrados disminuyeron de forma progresiva desde el mes de Agosto hasta el mes de Noviembre. Para el caso de los valores máximos, no se encontró una diferencia significativa para los meses evaluados (Ver Tabla N° 5).

Tabla N° 5. Registro de la temperatura máxima desde el mes Agosto hasta el mes de Noviembre de la estación de meteorológica de Ingenio. (SENAMHI, 2010)

Mes	Días evaluados	Media (C°)	DE	Valor min (C°)	Valor max (C°)
Agosto	31	20.57	1.25	17.8	22.8
Setiembre	30	19.77	1.67	15	22
Octubre	31	20.05	2.05	14.2	23.2
Noviembre	30	19.73	1.99	14	22.6
Total	122	20.04	1.78	14	23.2

[DE= desviación estándar ; Valor min= Valor mínimo mensual; Valor max= Valor máximo mensual]

Para el caso de la temperatura mínima se observaron valores menores a cero grados centígrados para el mes de Agosto y un aumento progresivo para los meses siguientes. Los valores máximos registrados aumentaron progresivamente desde el mes de Agosto hasta el mes de Noviembre. El valor de la media aumento de 0.75 °C para el mes de Agosto hasta 5.45 °C para el mes de Noviembre (ver Tabla N° 6).

Tabla 6. Registro de la temperatura mínima desde el mes Agosto hasta el mes de Noviembre de la estación de meteorológica de Ingenio. (SENAMHI, 2010)

Mes	Días evaluados	Media (C°)	DE	Valor min (C°)	Valor max (C°)
Agosto	31	0.75	2.94	-3.7	6.5
Setiembre	30	3.79	1.85	0.7	8.3
Octubre	31	4.7	2.05	1	8.2
Noviembre	30	5.45	2.94	2	17.5
Total	122	3.65	3.053655	0	17.5

[DE= desviación estándar ; Valor min= Valor mínimo mensual; Valor max= Valor máximo mensual]

El diferencial de temperatura diario se calculó entre la diferencia entre la temperatura mínima y la temperatura máxima registrada del día. Los valores mínimos y los valores máximos obtenidos disminuyeron para los meses de octubre y noviembre. La media de los valores también presentó menores valores para los meses de inicio de la época de lluvias en comparación a la época de estiaje (Ver Tabla N° 7).

Tabla N° 7. Registro del diferencial de temperatura diario desde el mes Agosto hasta el mes de Noviembre de la estación de meteorológica de Ingenio.

Mes	Días evaluados	Media (C°)	DE	Valor min (C°)	Valor max (C°)
Agosto	31	19.82	3.40	13.6	24.9
Setiembre	30	15.98	2.66	10.5	20.1
Octubre	31	15.35	3.46	9.4	20.9
Noviembre	30	14.28	3.99	2.5	19.8
Total	122	16.38	3.97	2.5	24.9

[DE= desviación estándar ; Valor min= Valor mínimo mensual; Valor max= Valor máximo mensual]

4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL AGUA.

Para el caso de los análisis de físico-químicos del agua, se realizaron a los estanques en donde se encontraba la población analizada. El parámetro de fosfatos aumentó 9 veces más para los meses de Octubre y Noviembre en comparación a los meses de Agosto y Setiembre. Para el caso de nitrato se presentó un mayor valor para el mes de Agosto, en relación a los otros meses del estudio. El pH aumentó su valor para los meses de Octubre y Noviembre. Los sólidos suspendidos presentaron valores variables para todos los meses de estudio. La temperatura registrada se encontró entre valores de 10.5 °C y 11.5 °C (ver Tabla N° 8).

Tabla N° 8. Resultados físico-químicos del agua de la piscigranja “El Edén”.

Mes	Fosfatos	Nitratos	Nitritos	Nitrógeno Amoniacal	Oxígeno Disuelto	pH	Sólidos Suspendidos	Temperatura (°C)
Agosto - Estanque 18	<0.03	0.2	<0.002	<1.0	6.9	7.01	14.9	11.5
Setiembre - Estanque 27	<0.03	<0.002	0.16	<1.0	7.16	7.54	13.00	10.9
Setiembre - Estanque 26	<0.03	<0.002	0.18	<1.0	6.34	7.3	13.00	10.5
Noviembre - Estanque 27	0.44	0.0005	0.16	<1.0	6.54	8	19	11.0
Noviembre - Estanque 26	0.44	< 0.0002	0.15	<1.0	7.93	8.68	12.2	11.3

4.3 DIAGNÓSTICO BIOLÓGICO

4.3.1 Resultados Histopatológicos.

Los dos tipos de hallazgos que se encontraron en las láminas histopatológicas analizadas se clasificaron en dos categorías: el tipo de lesión y el grado de lesión.

Para el caso del número de animales que presentaron algún tipo y grado de lesión en cada una de las etapas se hizo la Tabla 9, donde refleja el número de animales que presentaron algún tipo y grado lesión y animales que no presentaron lesiones:

Tabla N° 9. Número de truchas con algún tipo y grado de lesión evaluadas en las tres etapas del estudio.

Mes	Tejido Evaluado													
	Branquias		Estomago		Riñón		Intestino		Bazo		Ciegos Pilóricos		Hígado	
	CL	SL	CL	SL	CL	SL	CL	SL	CL	SL	CL	SL	CL	SL
Agosto	32	28	28	32	27	33	32	28	4	56	12	48	35	25
Setiembre	38	22	35	25	30	30	35	21	4	56	20	40	42	18
Noviembre	55	5	50	10	48	12	47	13	8	52	12	48	56	4

CL = Con lesión ; SL = Sin lesión

4.3.1.1 Estomago.

En el tejido estomacal se observó que todos los tipos de lesiones presentan un aumento de la frecuencia de lesiones desde el mes de Agosto al mes de Noviembre, siendo este último más alto respecto a los otros meses (ver Tabla N° 10).

Las lesiones más frecuentes descritas fueron una leve necrosis a nivel de la capa muscular, leve degeneración hidrópica en la capa muscular, moderada hiperplasia de la mucosa y presencia de mucus en el lumen. Para el caso de las células granulomatosas eosinofílicas se encontró un alto número a nivel de la submucosa (Ver Anexo N° 6).

Tabla N° 10. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido estomacal.

Mes	Infl. (Fr %)	Deg. (Fr%)	Adap (Fr%)	CGE (Fr%)
Agosto	10 (35.7)	4 (14.3)	10(35.7)	17(60.7)
Setiembre	19 (54.3)	4 (11.4)	15(42.9)	27(77.1)
Noviembre	26 (52)	24 (48)	18(36)	47(94)

Lesión inflamatoria: Infl. ; **Lesión Degenerativa:** Deg. ; **Adaptativa:** Adap. ; **Presencia de células granulares eosinofílicas:** CGE. **Fr%:** Frecuencia

En el caso del grado de lesiones, en la mayoría de los casos se observó una tendencia en presentar lesiones de un grado Leve a Moderado como se puede observar en la Tabla N° 11.

Para el mes de Noviembre, se presentó una mayor frecuencia para los dos grados mencionados anteriormente.

Tabla N° 11. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido estomacal.

Mes	Escaso (Fr%)	Leve (Fr%)	Moderado (Fr%)	Severo(Fr)
Agosto	1(3.6)	12(42.9)	5(17.9)	0(0)
Setiembre	4(11.4)	16(42.7)	7(20)	2(5.7)
Noviembre	0(0)	26(52)	23(46)	0(0)

Escaso= <25%; Leve = 25-50%; Moderado = 50-75%; Severo= > 75%. Fr%: Frecuencia

4.3.1.2 Branquias.

Para el caso de las branquias se presentó una mayor frecuencia de lesiones inflamatorias (36; 65.5%) y adaptativas (47; 85.5%) para el mes de Noviembre; pero, en el caso de las lesiones adaptativas, para los meses de Agosto y Setiembre han sido valores elevados. Los casos de lesiones degenerativas no han sido muy manifiestos (Ver Tabla N° 12). Las lesiones adaptativas con mayor frecuencia descritas son una leve a moderada hiperplasia del ápice de los filamentos y entre las lamelas. Para el caso del aumento de las lesiones inflamatorias del mes de Noviembre, se encontraron en la gran mayoría de los casos una fusión lamelar (Ver Anexo N° 6).

Tabla N° 12. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido branquial.

Mes	Infl. (Fr%)	Adap. (Fr%)	Deg. (Fr%)	Otros (Fr%)
Agosto	3(9.4)	32(100)	2(6.3)	8(25)
Setiembre	6(15.8)	29(76.3)	6(15.8)	8(21.1)
Noviembre	36(65.5)	47(85.5)	3(5.5)	5(9.1)

Lesión inflamatoria: Infl. ; Lesión Adaptativa: Adap. ; Lesiones Degenerativas: Deg. ; Otras lesiones: Otros. Fr%: Frecuencia

En el caso del grado de lesiones en las branquias se encontró un mayor número de tejidos con grados leve (29; 52.7%) y moderado (22; 40%) para el mes de Noviembre. En el caso de las lesiones de grado leve se mantenía una frecuencia considerable en los tres meses de estudio, denotando un aumento para el mes de Noviembre; pero, para el caso de las lesiones de grado moderado, solo se observó un aumento en la frecuencia de la lesión para el mes de noviembre (Ver Tabla N° 13).

Tabla N° 13. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido branquial.

Mes	Escaso (Fr%)	Leve (Fr%)	Moderado (Fr%)	Severo (Fr%)
Agosto	0 (0)	20 (62.5)	5(15.6)	0(0)
Setiembre	4 (10.5)	16 (42.1)	7(18.4)	2(5.3)
Noviembre	0 (0)	29 (52.7)	22(40)	1(1.8)

Escaso= <25%; Leve = 25-50%; Moderado = 50-75%; Severo= > 75%. Fr%: Frecuencia.

4.3.1.3 Riñón.

El tejido renal presentó un aumento de la frecuencia de las lesiones adaptativas para el mes de Noviembre (34; 70.8%); en cambio, para las lesiones de tipo degenerativas, los tres meses del estudio han presentado un aumento progresivo de la frecuencia presentando el mayor valor en el mes Noviembre (Ver Tabla N° 14). Las lesiones degenerativas descritas en mayor cantidad fueron la degeneración hidrópica a nivel del epitelio tubular. En el caso de las lesiones adaptativas del mes de Noviembre, se describieron en la totalidad de los casos una regeneración tubular (Ver Anexo N° 6).

Tabla N° 14. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido renal.

Mes	Deg. (Fr%)	Adap. (Fr%)	CMM (Fr%)	Otros (Fr%)
Agosto	15(55.6)	3(11.1)	5(18.5)	1(3.7)
Setiembre	23(76.7)	6(20)	5(16.7)	4(13.3)
Noviembre	41(85.4)	34(70.8)	12(25)	5(10.4)

Lesión degenerativo: Deg. ; Lesión adaptativos: Adap. ; Células melanomacrófagos: CMM; Otros lesiones: Otros. Fr% = Frecuencia.

Para el caso de los grado de lesiones en el tejido renal se observó que la mayoría de los casos presentan lesiones de grado leve, con una mayor frecuencia para el mes de Noviembre (Ver Tabla N° 15),

Tabla N° 15. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido renal.

Mes	Escaso (Fr%)	Leve (Fr%)	Moderado (Fr%)	Severo (Fr%)
Agosto	1 (3.7)	10 (37)	6 (22.2)	0 (0)
Setiembre	4 (13.3)	16 (53.3)	7 (23.3)	2 (6.7)
Noviembre	0 (0)	42 (87.5)	4 (8.3)	0 (0)

Escaso= <25%; Leve = 25-50%; Moderado = 50-75%; Severo= > 75%. Fr%: Frecuencia

4.3.1.4 Intestino delgado.

En el tejido intestinal, el tipo de lesiones más frecuentes fueron lesiones degenerativas y la presencia de células granulo eosinofílicas, manifestándose una mayor frecuencia en el mes de Noviembre. Para el caso de lesiones inflamatorias y adaptativas se incrementaron al doble para el mes de Noviembre. Para el caso de las lesiones degenerativas se encontraron a nivel de la capa muscular y para el caso de las lesiones adaptativas se encontrado cuadros de hiperplasia y producción de mucus (Ver Tabla N° 16).

Tabla N° 16. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido intestinal.

Mes	Infl. (Fr%)	Adap. (Fr%)	Deg (Fr%)	CGE (Fr%)
Agosto	12 (37.5)	10 (31.3)	16 (50)	10 (31.3)
Setiembre	12 (34.3)	10 (28.6)	24(68.6)	18 (51.4)
Noviembre	20 (42.6)	22 (46.8)	32 (68.1)	34 (72.3)

Lesión inflamatoria: Infl. ; **Lesión Adaptativa:** Adap. ; **Lesiones Degenerativas:** Deg. ; **Células Granulo Eosinofílicas:** CGE. **Fr%:** Frecuencia.

En el caso del grado de las lesiones descritas en el intestino se denota un mayor número de tejidos con lesiones leves y moderadas, específicamente en el mes de Noviembre (Ver Tabla N° 17).

Tabla N° 17. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un grado de lesión a nivel del tejido intestinal.

Mes	Escaso (Fr%)	Leve (Fr%)	Moderado (Fr%)	Severo (Fr%)
Agosto	4 (12.5)	12 (37.5)	8 (25)	4 (12.5)
Setiembre	4 (11.4)	16 (45.7)	7 (20)	2 (5.7)
Noviembre	0 (0)	21 (44.7)	26 (55.3)	0 (0)

Escaso= <25% ; Leve = 25-50% ; Moderado = 50-75% ; Severo= > 75%. Fr%: Frecuencia.

4.3.1.5 Ciegos Pilóricos.

En el caso del tejido cecal se ha encontrado 10 animales con un frecuencia de 33.3 % y 10 animales con una frecuencia de 83.3 % de lesiones adaptativas para los meses de Setiembre y Agosto, respectivamente (Ver Tabla N° 18).

Tabla N° 18. Animales que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido cecal.

Mes	Infl. (Fr%)	Deg. (Fr%)	Adap. (Fr%)	Otros (Fr%)
Agosto	2 (16.7)	1 (8.3)	10 (83.3)	4 (33.3)
Setiembre	7 (23.3)	0 (0)	10 (33.3)	8 (26.7)
Noviembre	5 (41.7)	0 (0)	5 (41.7)	2 (16.7)

Lesión inflamatoria: Infl. ; **Lesión Degenerativo:** Deg. ; **Lesiones Adaptativas:** Adap. ; **Otras lesiones:** Otros. **Fr%:** Frecuencia.

El grado de la lesiones a nivel cecal no ha manifestado ninguna diferencia para los tres meses del estudio (Ver Tabla N° 19).

Tabla N° 19. Animales que presentan un grado de lesión a nivel del tejido cecal.

Mes	Escaso (Fr%)	Leve (Fr%)	Moderado (Fr%)	Severo (Fr%)
Agosto	3 (25)	10 (83.3)	6 (50)	0 (0)
Setiembre	4 (20)	10 (50)	7 (35)	2 (10)
Noviembre	0 (0)	7 (58.3)	1 (8.3)	0 (0)

Escaso= <25%; Leve = 25-50%; Moderado = 50-75%; Severo= > 75%. Fr%: Frecuencia

4.3.1.6 Bazo

No se ha encontrado un aumento en la frecuencia de células melanomacrófagas dentro de todo el tiempo de estudio (Ver Tabla N° 20).

Tabla N° 20. Frecuencia de truchas arcoíris que presentan un tipo de lesión a nivel del tejido esplénico.

Mes	CMM (Fr%)	Otros (Fr%)
Agosto	3 (75.5)	1 (25)
Setiembre	2 (50)	2 (50)
Noviembre	5 (62.5)	3 (37.5)

Células melanomacrófagas: CMM ; Otras lesiones: Otros y Fr%: Frecuencia

4.3.2 Asociación entre el Diagnóstico Bacteriológico y el Diagnóstico Molecular

Se elaboró una tabla para observar la relación de asociación entre el diagnóstico bacteriológico y el diagnóstico molecular. El resultado reflejó que no existe asociación entre ambos diagnósticos (Ver Tabla N° 21).

Tabla N° 21. Asociación entre el diagnóstico molecular y el diagnóstico bacteriológico para *Yersinia ruckeri*.

Diagnóstico Molecular	Diagnóstico Bacteriológico		
	Negativo	Positivo	TOTAL
Positivo	8	10	170
Negativo	160	2	10
Total	168	12	180

[Chi 2 = 0.082]

Las frecuencias obtenidas, en base al criterio de diagnóstico de presencia de *Yersinia ruckeri* que hemos establecido para el estudio, se encontró los siguientes resultados para cada uno de las etapas del estudio (Ver Tabla N° 22).

Tabla N° 22 Frecuencia del diagnóstico para la presencia de *Yersinia ruckeri* para cada una de las etapas del estudio

Mes	N° de muestras (Fr%)
Agosto	6 (10)
Setiembre	3 (5)
Noviembre	10(16.7)

4.3.3 Asociación de Descripción Histopatológica con el Diagnóstico para la presencia de *Yersinia ruckeri*.

4.3.3.1 Hígado.

El resultado que se obtuvo fue que no existe asociación entre la manifestaciones histopatológicas en el grado de lesión en el hígado y la presencia de la bacteria *Yersinia ruckeri* (Ver Tabla N° 23).

Tabla N° 23. Evaluación de la asociación entre la Degeneración Hepática con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Degeneraciones Hepáticas	Diagnóstico Negativo	Diagnóstico Positivo	TOTAL
Sin degeneración	42	8*	50
Con degeneración	118	12**	130
TOTAL	160	20	180

. * DE = 0.0153603; IC = 0 .0193805 - 0.0856926

** DE = 0.0185924; IC = 0.0349194 - 0 .113557

(DE=desviación estándar; IC = intervalo de confianza) [chi2 = 0.196] [95% Conf. Intervalo]

4.3.3.2 Riñón.

Las lesiones renales no presentaban un asociación con el diagnóstico para *Yersinia ruckeri* (Ver Tabla N° 24).

Tabla N° 24. Evaluación de la asociación entre los tejidos renales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Lesiones Renales	Diagnóstico Negativo	Diagnóstico Positivo	TOTAL
Sin lesiones	76	10*	86
Con lesiones	84	10**	94
TOTAL	160	20	180

. * DE = .0170732; IC = 0.0269593 - 0.0997936

** DE = .0170732; IC = 0.0269593 - 0.0997936

(DE=desviación estándar; IC = intervalo de confianza) [chi2 = 0.833] [95% Conf. Intervalo]

4.3.3.3 Branquias.

En el tejido branquial no se ha observado asociación entre las lesiones identificadas en el tejido con el diagnóstico (Ver Tabla N° 25).

Tabla N° 25. Evaluación de la asociación entre los tejidos branquiales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Lesiones Branquiales	Diagnóstico Negativo	Diagnóstico Positivo	TOTAL
Sin lesiones	56	7*	63
Con lesiones	104	13**	117
TOTAL	160	20	180

* DE = 0.01441; IC = 0.015776 - 0.0784818

** DE = 0.019294; IC = .0390137 - 0.1203358

(DE=desviación estándar; IC = intervalo de confianza) [chi2 = 1.000] [95% Conf. Intervalo]

4.3.3.4 Estómago.

Para el caso del tejido estomacal no se identificó la asociación entre las lesiones estomacales identificadas en el análisis histopatológico con el diagnóstico para la presencia de *Yersinia ruckeri* (Ver Tabla N° 26).

Tabla N° 26. Evaluación de la asociación entre los tejidos estomacales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*.

Lesiones Estomacales	Diagnóstico Negativo	Diagnóstico Positivo	TOTAL
Sin lesiones	80	10*	90
Con lesiones	80	10**	90
TOTAL	160	20	180

* DE = 0.01441; IC = 0.0269593 - 0.0997936

** DE = 0.01441; IC = 0.0269593 - 0.0997936

(DE=desviación estándar; IC = intervalo de confianza) [chi2 = 1.000] [95% Conf. Intervalo]

4.3.3.5 Ciego.

Para el caso en determinar la asociación entre los hallazgos histopatológicos en el ciego con el diagnóstico para la presencia de *Yersinia ruckeri*, no se ha encontrado asociación entre las variables como se denota en la Tabla N° 27.

Tabla N° 27. Evaluación de la asociación entre los tejidos cecales con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri* (DE=desviación estándar; IC = intervalo de confianza) [chi2 = 0.475] [95% Conf. Intervalo]

Lesiones Estomacales	Diagnóstico Negativo	Diagnóstico Positivo	TOTAL
Sin lesiones	116	16*	132
Con lesiones	44	4	48
TOTAL	160	20	180

* DE = 0.0212116; IC = 0.0516635 - 0.1403362

** DE = 0.010987; IC = 0.0060872 - 0.0559177

(DE=desviación estándar; IC = intervalo de confianza) [chi2 = 0.475] [95% Conf. Intervalo]

4.3.3.6 Bazo.

Para el caso del tejido esplénico se pudo observar (Ver Tabla N° 28) que no existía relación entre las lesiones histopatológicas identificadas en las muestras analizadas y el diagnóstico para la presencia de *Yersinia ruckeri*.

Tabla N° 28. Evaluación de la asociación entre los tejidos esplénicos con lesiones y sin lesiones con los resultados positivos y negativos para *Yersinia ruckeri*

Lesiones Esplénicas	Diagnóstico Negativo	Diagnóstico Positivo	TOTAL
Sin lesiones	120	12*	132
Con lesiones	40	8	48
TOTAL	160	20	180

* DE = 0.0214136; IC = 0.0516635 - 0.1503472

** DE = 0.011297; IC = 0.0050862 - 0.0459177

(DE=desviación estándar; IC = intervalo de confianza) [chi2 = 0.461] [95% Conf. Intervalo]

V. DISCUSIÓN.

Las precipitaciones durante el tiempo de estudio no se asemejaron a la climatología descrita para la estación de Ingenio (IGP, 2005a). La suma de las precipitaciones acumuladas para el tiempo del muestreo fue de 127.9 mm; a diferencia del acumulado registrado para la estación de Ingenio, el cual tiene un valor de 182 mm (IGP, 2005a).

Esta disminución global del volumen de las precipitaciones pudo haber influido en la dinámica de la manifestación de la “Boca Roja”. *Yersinia ruckeri* tiene facilidad de elaborar biofilms en sustratos o materiales dentro de los sistemas acuícolas como son las micro algas, paredes de estanques, etc. (Coquet *et al.*, 2002). Ante la disminución de las precipitaciones, el transporte del material geológico de la cuenca del río Achamayo podría haber disminuido; por lo tanto, el sustrato en donde *Yersinia ruckeri* generaría los biofilms no se manifestarían. Se asumen que la presencia de biofilms sería la fuente de procesos de reinfección en piscigranjas de truchas arcoíris (Coquet *et al.*, 2002).

En el caso de la piscigranja “El Edén” ha presentado varios brotes de *Yersinia ruckeri*. Para la campaña del año 2009, en los mismos meses de análisis del trabajo que se realizó. Las precipitaciones de esta campaña fueron 3 veces más que las presentadas para la campaña en donde se realizó el estudio (SENAMHI, 2011).

Las temperaturas evaluadas no presentaron diferencias entre los datos de la climatología registrada para la estación de Ingenio. El rango óptimo para el desarrollo de las truchas arcoíris es de 9-14 °C, el valor mínimo y el valor máximo es de 0 °C y de 27 °C, respectivamente. La temperatura que se registró en el tiempo de evaluación del estudio se encontraba dentro de estos rangos, así que no se encontraba alguna condición de vulnerabilidad por parte de las truchas con respecto al parámetro de la temperatura. Para el caso *Yersinia ruckeri* no se ha encontrado una diferencia en el comportamiento al estar expuesto a 16°C y 20°C (Fernandez *et al.*, 2003). La infección se presenta en animales jóvenes cuando existe un brusco aumento de la temperatura del agua (Bomo *et al.*, 2004). Para los estanques en donde se tomaron las muestras la temperatura fue constante durante todo el tiempo de estudio.

Las temperaturas máximas en los meses del estudio han estado por encima de un 1 a 2 °C del promedio consignado en la climatología para la estación de Ingenio (IGP, 2005a). La influencia de la temperatura ambiental sobre la temperatura del agua de los estanques en acuicultura no es total, solo llega a tener influencia sobre la temperatura superficial del estanque (Raida y Buchmann, 2007),

también se debe de considerar parámetros como el efecto de la radiación y el volumen del caudal y la velocidad de recambio del agua contenida dentro del estanque, etc. En el caso de la temperatura mínima, el promedio de temperatura ha disminuido de 2 a 3 °C, en comparación al promedio histórico registrado en la climatología para la estación (IGP, 2005a), aún así, los valores encontrados para la temperatura mínima, se encontraron dentro del rango de tolerancia térmica de la trucha arcoíris. El diferencial de temperatura diaria de los meses evaluados ha presentado su mayor valor en el mes de Agosto la presentar una media de 19.8 °C.

En cambio, en los meses restantes se ha registrado un diferencial térmico diario entre 14.3 y 15.9 °C. Este comportamiento del clima nos confirmaría que las variables climáticas están presentando valores diferentes a su promedio; pero, sin presentarse un cambio brusco de la temperatura, el cual debería en consecuencia; especialmente en animales jóvenes, manifestaciones de la “Boca Roja” (Bomo *et al.*, 2004).

Los valores físico-químicos del agua de los estanques no reflejaron alguna alteración notoria; solo en el caso de los valores de los Fosfatos y el pH determinado para los meses. Para ambos parámetros aumento valores para las dos últimas etapas de muestreo. En el caso de Fosfatos, se podría deber al aumento de la presencia del sedimento dentro de la piscigranja; además, al iniciarse la época de lluvias, los acuicultores dedican menor tiempo para el manejo de la piscigranja, en razón de tratar de mitigar los efectos de las altas precipitaciones en la estructura de la piscigranja. El valor de pH se debería a un efecto paralelo por el aumento del valor del Fosfato. Ambas valores podrían condicionar a las truchas arcoíris la manifestación de *Yersinia ruckeri*. Este agente, como la mayoría de los patógenos que afectan a los individuos acuáticos, son oportunistas o facultativos (Rubio M, 2010); por ello, ante las condiciones ambientales se debe de considerar que el estado de salud de los animales acuáticos depende de la geomorfología, limnología e hidrología del medio acuático en donde se encuentran los animales (Hedrick, 1998) como es el caso de la piscigranja “El Edén” que se encuentra en la cuenca del río Achamayo.

La mayoría de los tejidos evaluados han presentado un grado de lesión leve o moderada. Esto puede relacionarse con el proceso crónico de las manifestaciones de *Yersinia ruckeri* en la piscigranja evaluada. *Yersinia ruckeri* se manifiesta con mayor frecuencia ante variaciones ambientales. Cuando se ha reportado la enfermedad en una piscigranja, los signos aparecen a los 3-5 días post-infección; y, en el caso que no se haya reportado la presencia de la misma, se presentaría 7-10 días post-infección. Para el caso de la piscigranja “El Edén”, no se ha presentado las condiciones para la manifestación de la enfermedad. *Yersinia ruckeri* tiene una comportamiento septicémico

sobre el animal, el cual no se ha visto reflejado en los hallazgos en materia del tipo y el grado de las lesiones.

Los tipos de lesiones variaron de acuerdo al tejido evaluado. El tejido estomacal presentó un mayor número de lesiones inflamatorias, degenerativas, adaptativas con un aumento de la presencia de células granulo eosinofílicas para el caso del mes de Noviembre. La mayoría de procesos inflamatorios están asociados a cuadros de necrosis moderadas acompañados de un proceso degenerativo leve a nivel de la capa muscular del tejido. La presencia de las células granulares eosinofílicas era moderada; además, se denotaba un aumento en la presencia del mucus intestinal.

Se debe de considerar que el intestino delgado forma parte del sistema inmune de los peces. Estas alteraciones aparentemente denotan un proceso de adaptación ante un estímulo, el cual podría darse por el tipo y la presentación del alimento que se utilizan en la piscigranja “El Edén”. El tamaño de los pellets ofrecidos a los animales, condicionaría a un proceso de adaptación por parte del tejido. Para el caso de las células granulares eosinofílicas normalmente se encuentran en el tejido conectivo, especialmente en tracto gastrointestinal y branquias (Anderson *et al.*, 1979; Gunasena *et al.*, 2003), así que su presencia, es característica ante un proceso de probable injuria, el cual se corroboraría con la presencia de lesiones inflamatorias descritas en el estudio.

En el caso de las branquias, se observó un mayor número de tipos lesiones relacionadas a procesos inflamatorios y adaptativos, los cuales se caracterizaban de presentar acortamiento o fusión de vellosidades y una leve a moderada hiperplasia en epitelio lamelar, respectivamente. Estos hallazgos no coincide con las manifestaciones agudas de *Yersinia ruckeri* en el tejido branquial, el cual presenta edema, hiperemia y descamación de las células epiteliales en las lamelas secundarias y lamelas primarias (Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009); sin embargo, puedan ser producto de la calidad del agua.

El tejido renal presentó lesiones degenerativas y adaptativas. Las lesiones degenerativas eran leves procesos degenerativos hidrópicos tubulares con un proceso regenerativo tubular. En algunos casos se ha encontrado presencia de células melanomacrófagas. En el caso del tejido renal son poco notorios los cambios en los túbulos renales; sin embargo, se observó en algunos animales una proliferación de las células mesangiales. En los casos que se observe un aumento de las célula melanomacrófagas en el tejido renal se le ha relacionado a procesos de nefritis crónica (Tobback *et al.*, 2009).

El intestino delgado es lugar en donde *Yersinia ruckeri* se aloja en los individuos portadores. En el tejido de intestino se ha encontrado una leve a moderada presencia de las células granulo eosinofílicas, esta presencia reforzaría la idea de un estímulo de injuria constante sobre el tejido intestinal. Ante esta situación, *Yersinia ruckeri* también tiene la capacidad de adherirse a la superficie intestinal después de un proceso de infección (Tobback *et al.*, 2010b).

La eliminación intestinal de *Yersinia ruckeri* permite la recurrencia de la infección. Luego de realizado el muestreo, para los meses de lluvias del año 2011 (Febrero y Marzo), se presentó un brote de “Boca Roja”, según informaron el dueño y los técnicos de la piscigranja de estudio. La infección mediante individuos portadores presenta un papel importante bajo condiciones de estrés (Capkin y Altinok, 2009), el cual habría ocasionado este brote; pero no así, en los meses de la investigación desarrollada. Para el caso de las lesiones a nivel del ciego pilórico y del bazo no se han manifestado lesiones notorias. En el caso de infección de *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris la principal lesión a nivel esplénico es una necrosis focal. En nuestro estudio no se ha encontrado este tipo de lesión probablemente el proceso que se manifestaba era un proceso crónico y no agudo.

En nuestro trabajo también se evaluó la asociación entre el diagnóstico bacteriológico y el diagnóstico molecular. Se encontró, que no existía asociación entre el diagnóstico de las dos pruebas. Esto puede deberse a varias razones: una de ellas, es que medio de aislamiento de *Yersinia ruckeri*, no fue específico, el medio de cultivo utilizado fue TSA (Secades y Guijarro, 1999, Arias *et al.*, 2007). Además, el resultado de la batería de pruebas bioquímicas puede presentar una similitud con la bacteria *Hafnia alvei* (Furones *et al.*, 1993). En el caso de la prueba molecular, el escaso número de positivos se deba a la sensibilidad de la detección del material genético de la bacteria evaluada, lo que indicaría que las muestras por medio del diagnóstico molecular como positivas, fueron individuos falsos positivos.

Luego de ser evaluados los dos métodos de diagnóstico, ajustamos el criterio de análisis y se consideró a los individuos positivos tanto los animales que tenía diagnóstico bacteriológico positivo y/o diagnóstico molecular positivo; además, se ajustó en el diagnóstico histopatológico a dos categorías de evaluación: Con lesiones/degeneraciones y sin lesiones/degeneraciones.

Para el caso del tejido hepático, se denotó que no existía asociación entre la presencia de las lesiones degenerativas en el hígado. Los grados de degeneración hepática de tipo II y III se relaciona más con un alto contenido protéico a nivel de la dieta ofrecida a los animales. En otros estudios, se ha determinado diferentes tipos de degeneraciones grasas en donde los hepatocitos se han vuelto pequeños y han desaparecido los espacios sinusoidales (Tobback *et al.*, 2009).

La frecuencia del diagnóstico de la presencia de *Yersinia ruckeri* para cada una de las etapas del estudio mostró valores menores a los descritos estudios (Gibello *et. al.*, 2004; A. del Cerro *et al.*, 2002). Estos estudios fueron con animales infectados, en contraposición, a la procedencia de nuestras muestras de estudio, las cuales fueron de campo. Las bajas frecuencias del estudio puede sugerir que se identifico un proceso crónico de un infección de *Yersinia ruckeri*.

La evaluación de asociación entre la presencia de lesiones en los tejidos evaluados con el diagnóstico a *Yersinia ruckeri*, no se ha encontrado una relación de ese tipo entre las variables evaluadas. Esto puede deberse a que las condiciones geomorfológicas, limnológicas e hidrológicas del medio acuático como es la microcuenca del río Achamayo no hayan sido las propicias para el brote de “Boca Roja”. La presencia de *Yersinia ruckeri*, si se pudo comprobar con los animales diagnosticados como positivos; pero, la manifestación de la enfermedad necesita varios factores para su patencia.

VI. CONCLUSIONES.

- Los resultados de diagnóstico positivo para la presencia de *Yersinia ruckeri* reflejan un proceso crónico en la piscigranja de estudio.
- No se ha encontrado asociación entre las lesiones histopatológicas con el diagnóstico positivo a *Yersinia ruckeri* durante el tiempo del estudio.
- Se confirmó la presencia de *Yersinia ruckeri* en la piscigranja “El Edén”.
- Se recomienda incluir en los próximos estudios a los meses de precipitaciones más elevadas descritas para la climatología del Valle del Mantaro.

VII. LITERATURA CITADA

1. Abbass A., Sharifuzzaman SM, Austin B. 2010. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 33: 31-37.
2. Altinok I, Grizzle JM, Liu Z. 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Dis Aquat Organ 44: 29-34.
3. Anderson DP, Dixon OW, Roberson BS. 1979. Kinetics of the primary immune response in rainbow trout after flush exposure to *Yersinia ruckeri* O-antigen. Dev Comp Immunol 3: 739-744.
4. Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker CA, Grizzle JM, Klesius PH. 2007. First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the USA. J Aquat Anim Health 19: 35-40.
5. Austin DA, Robertson PA, Austin B. 2003. Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Syst Appl Microbiol 26: 127-131.
6. Beynon LM, Richards JC, Perry MB. 1994. The structure of the lipopolysaccharide O antigen from *Yersinia ruckeri* serotype 01. Carbohydr Res 256: 303-317.
7. Bomo AM, Ekeberg D, Stevik TK, Hanssen JF, Frostegard A. 2004. Retention and removal of the fish pathogenic bacterium *Yersinia ruckeri* in biological sand filters. J Appl Microbiol 97: 598-608.
8. Bourne DG, Garren M, Work TM, Rosenberg E, Smith GW, Harvell CD. 2009. Microbial disease and the coral holobiont. Trends Microbiol 17: 554-562.
9. Buchmann K, Nielsen ME, Nielsen CV. 2003. Immune responses against *Yersinia ruckeri* have no effect on colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by *Gyrodactylus derjavini* (Mikailov, 1975). J Fish Dis 26: 183-186.
10. Capkin E, Altinok I. 2009. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. J Appl Microbiol 106: 1147-1153.
11. Chavez. E. 2008. Frecuencia y características de lesiones anatomohistopatológicas compatibles con alteraciones metabólicas relacionadas a energía y/o proteínas en la dieta de Truchas Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Unic. Nac. Mayor de San Marcos. 40p.
12. Choongo K, Hang'ombe B, Samui K, Syachaba M, Phiri H, Maguswi C, Muyangaali K, Bwalya G, Mataa L. 2009. Environmental and Climatic Factors Associated with Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) in Fish from the Zambezi Floodplains, Zambia. 2009. Bull Environ Contam Toxicol 83:474-478.
13. Cipriano RC, Schill WB, Pyle SW, Horner R. 1986. An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitol-positive serovar 2 strain of *Yersinia ruckeri*. J Wildl Dis 22: 488-492.

14. Concha F. 1998. Caracterización bioquímica, electroforética y sensibilidad antibióticas de cepas *Yersinia ruckeri* aisladas desde salmón del atlántico (*Salmon salar*). Tesis de Médico Veterinario. Santiago: Univ. Austral de Chile. 7 p.
15. Coquet L, Quillet L, Petit F, Junter G, Jouenne T. 2002. Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. *Appl Environ Microbiol* 68: 470-5.
16. Cossarini-Dunier M, Demael A, Lepot D, Guerin V. 1988. Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. *Dev Comp Immunol* 12: 573-9.
17. Cutrin JM, Conchas RF, Barja JL, Toranzo AE. 1994. Electrotransformation of *Yersinia ruckeri* by plasmid DNA. *Microbiologia* 10: 69-82.
18. Dahiya I., Stevenson R. 2010. *Yersinia ruckeri* genes that attenuate survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are identified using signature-tagged mutants. *Vet Microbiol* 144: 399-404.
19. Davies RL. 1990. O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. *Vet Microbiol*, 22: 299-307.
20. Davies RL. 1991a. Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. *Vet Microbiol* 26: 125-40.
21. Davies RL. 1991b. Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Vet Microbiol* 29: 289-97.
22. De Grandis S, Stevenson R. 1985. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrob Agents Chemother*, 27: 938-42.
23. De Silva, Soto, D. 2009. Climate change and aquaculture: potential impacts, adaptation and mitigation. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 530: 151-212.
24. Del cerro A, Marquez I, Guijarro JA. 2002. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*, 68: 5177-5180.
25. Evenhuis JP, Lapatra SE, Verner-Jeffreys DW, Dalsgaard I, Welch TJ. 2009. Identification of flagellar motility genes in *Yersinia ruckeri* by transposon mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, 75: 6630-6633.
26. [FAO]. Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura. 2003. Revisión del estado mundial de la acuicultura. Circular de Pesca Circular de Pesca.
27. [FAO]. Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura. 2009. Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department.
28. Fernández L, López JR, Secades P, Menéndez A, Márquez I, Guijarro JA. 2003. In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl Environ Microbiol*, 69: 7328-7335.

29. Fernández L, Márquez I, Guijarro JA. 2004. Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5199-5207.
30. Fernández L, Méndez J, Guijarro JA. 2007a. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Vet Microbiol*, 125: 1-10.
31. Fernández L, Prieto M, Guijarro JA. 2007b. The iron- and temperature-regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*. *Microbiology*, 153: 483-489.
32. Fernández L, Secades P, López JR, Márquez I, Guijarro JA. 2002. Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. *Microbiology*, 148: 2233-2243.
33. Ficke A, Hansen A, Lara J. 2007. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries *Rev Fish Biol Fisheries*, 17: 581-613.
34. Fouz B, Zarza C, Amaro C. 2006. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *J Fish Dis*, 29: 339-346.
35. Furones MD, Gilpin MJ, Alderman DJ, Munn CB. 1990. Virulence of *Yersinia ruckeri* serotype I strains is associated with a heat sensitive factor (HSF) in cell extracts. *FEMS Microbiol Lett*, 54: 339-343.
36. Furones M, Gilpin M, Munn, C. 1993. Culture media for the differentiation of isolates of *Yersinia ruckeri*, based on detection of a virulence factor. *J Appl Bacteriol*, 74: 360-366.
37. Garcia J, Dominguez L, Larsen J, Pedersen K. 1998. Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. *J Appl Microbiol*, 85: 949-955.
38. Gibello A, Porrero M, Blanco M, Vela A, Liebana P, Moreno M, Fernandez J, Dominguez L. 2004. Analysis of the *gyrA* gene of clinical *Yersinia ruckeri* isolates with reduced susceptibility to quinolones. *Appl Environ Microbiol*, 70: 599-602.
39. Gunasena D, Komrower J, Macyntyre S. 2003. The fish pathogen *Yersinia ruckeri* possesses a TTS system. *Adv Exp Med Biol*, 529: 105-117.
40. Haig S, Davies R, Welch T, Reese R, Verner D. 2010. Comparative susceptibility of Atlantic salmon and rainbow trout to *Yersinia ruckeri*: relationship to O antigen serotype and resistance to serum killing. *Vet Microbiol*, 147: 155-61.
41. Hamdi Avci, S. Serap Bürüncüoğlu. 2005. Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. *Turk J Vet Anim Sci* 29: 1321-1328.
42. Handisyde, N.T., Ross, L.G., Badjeck, M-C. & Allison, E.H. 2006. The effects of climate change on world aquaculture: a global perspective. Final Technical Report, DFID Aquaculture and Fish Genetics Research Programme, Stirling Institute of Aquaculture, Stirling, U.K., 151 pp. Disponible en www.aqua.stir.ac.uk/GISAP/pdfs/Climate_full.pdf.
43. Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296: 2158-2162.

44. Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus AD, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta GR. 1999. Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285:1505-1510.
45. Herbert N, Gagne F, Cejka P, Cyr D, Marcogliese D, Blaise C, Pellerin J, Fournier M. 2008. The effects of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): exposure duration and contribution of suspended particles. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 148: 258-264.
46. Hedrick P. 1998. Relationships of the host, pathogen, and environment: implications for diseases of cultured and wild fish populations. *J Aqua Anim Health* 10:107-111.
47. [IGP] Instituto Geofísico del Perú, 2005a. Diagnóstico de la cuenca del Mantaro bajo la visión del cambio climático. Editor, CONAM - Consejo Nacional del Ambiente.
48. [IGP] Instituto Geofísico del Perú, 2005b. Atlas climático de precipitación y temperatura del aire en la cuenca del río mantaro. Editor, CONAM - Consejo Nacional del Ambiente.
49. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2010. Junín: Compendio Estadístico Departamental.
50. Kim K, Alker A, Shuster K, Quirolo C, Harvell C. 2006. Longitudinal study of aspergillosis in sea fan corals. *Dis Aquat Organ*, 69: 95-99.
51. Lapatra, S. 2003. The lack of scientific evidence to support the development of effluent limitations guidelines for aquatic animal pathogens. *Aquaculture*: 191-199.
52. Lejeune J, Rurangirwa F. 2000. Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. *J Vet Diagn Invest*, 12: 558-61.
53. Lucangeli C, Morabito S, Caprioli A, Achene L, Busani L, Mazzolini E, Fabris A, Macri A. 2000. Molecular fingerprinting of strains of *Yersinia ruckeri* serovar O1 and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated in Italy. *Vet Microbiol*, 76: 273-81.
54. Mammeri H, Poirel L, Nazik H, Nordmann P. 2006. Cloning and functional characterization of the ambler class C beta-lactamase of *Yersinia ruckeri*. *FEMS Microbiol Lett*, 257: 57-62.
55. Marcogliese DJ. 2008. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. *Rev Sci Tech* 27: 467-484.
56. Markkula S, Karvonen A, Salo H, Tellervo E, Ilmari E. 2007. Ultraviolet B irradiation affects resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against bacterium *Yersinia ruckeri* and trematode *Diplostomum spathaceum*. *Photochem Photobiol*, 83: 1263-9.
57. Mendez J, Reimundo P, Perez-Pascual D, Navais R, Gomez E, Guijarro J. 2010. A novel *cdsAB* operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in the pathogenesis of *Yersinia ruckeri*. *J Bacteriol* 193: 944-951.
58. [MINAM] Ministerio del Ambiente. 2010. Segunda Comunicación Nacional del Perú a la Convención Marco de las Naciones Unidas del Cambio Climático.
59. Mydlarz L, Couch C, Weil E, Smith G, Harvell C. 2009. Immune defenses of healthy, bleached and diseased *Montastraea faveolata* during a natural bleaching event. *Dis Aquat Organ*, 87: 67-78.

60. Navais R, Mendez J, Reimundo P, Perez-Pascual D, Gomez E, Guijarro J. 2010. The yctCBA operon of *Yersinia ruckeri* involved in in vivo citrate uptake is not necessary for virulence. *Appl Environ Microbiol* 77: 1107-1110.
61. Neumann D, Tripp M. 1986. Influence of route of administration on the humoral response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Yersinia ruckeri*. *Vet Immunol Immunopathol*, 12: 163-174.
62. Noga E, Levine J, Townsend K, Bullis R, Carlson C, Corbett W. 1988. Kidney biopsy: a nonlethal method for diagnosing *Yersinia ruckeri* infection (enteric redmouth disease) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Am J Vet Res*, 49: 363-5.
63. Ögüt K, Reno P. 2005. Effects of host density on furunculosis epidemics determined by the simple SIR model. *Prev Vet Med*, 71: 83-90.
64. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006a. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Sección 2.1. Enfermedades de los peces. Capítulo I.1. (Información general traducción en español de la 5ª edición). Pag 73-87.
65. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006b. Código Sanitario para los Animales Acuáticos 2009. Título 1. Capítulo 1.4 Vigilancia de sanidad de los animales acuáticos.
66. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006. Collaborating Centre for Information on Aquatic Diseases 2009. <http://www.collabcen.net/> ; <http://www.collabcen.net/idaad/species.aspx?id=272>
67. Palomino. R. 2008. Identificación de lesiones anatomohistopatológicas y aislamiento bacteriológico de Truchas Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la provincia de Melgar en el Departamento de Puno. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
68. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2008a. La Acuicultura en el Perú. [Internet].
69. [PRODUCE]. Ministerio de la Producción. 2008b. Información Sectorial. Cifras Estadísticas. Acuicultura [Internet].
70. [PROMPERU] Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo. 2009. Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero en el Perú - 2008.
71. Raida M, Buchmann K. 2007. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis Aquat Organ*, 77: 41-52.
72. Raida M, Buchmann K. 2008. Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 533-41.
73. Raida M, Buchmann K. 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Dev Comp Immunol*, 33: 35-45.
74. Raida M, Larsen J, Nielsen M, Buchmann K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral

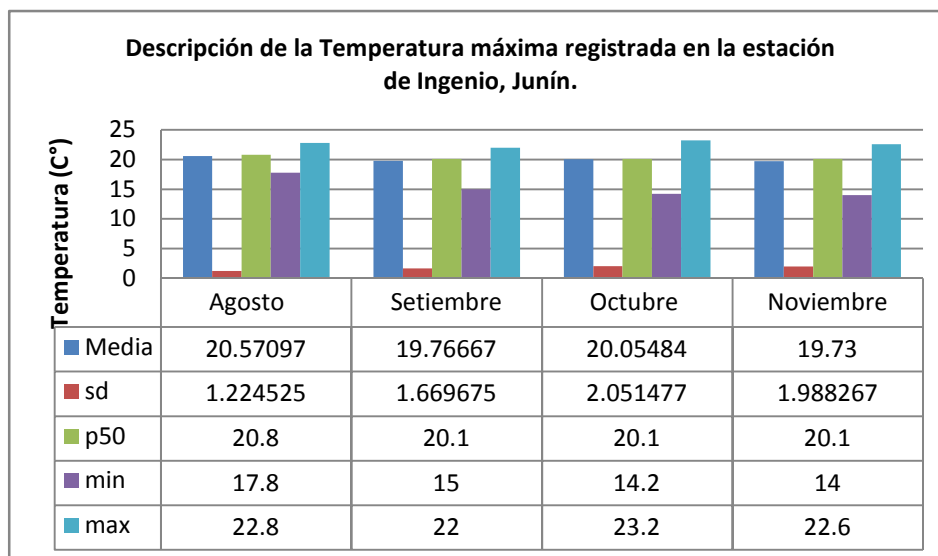
- administration of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (BioPlus2B). J Fish Dis, 26: 495-498.
75. Romalde J, Toranzo A. 1993. Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiol Lett, 112: 291-299.
 76. Romalde J, Toranzo A. 1993. Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the redmouth diseases. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol, 11, 147-150.
 77. Rakocy, J. E. 2005. Programa de información de especies acuáticas. Text by In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 18 February 2005. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es
 78. Rubio M, Cabrera A, Coffigny R, Aguilera Y. Bacterial variability in during the rainy and dry seasons cultured in freshwater environment in different regions of Cuba. 2010. Revista electrónica de Veterinaria. Volumen 11:1695-7504 [Internet], [Julio, 2010]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070710/071019.pdf>
 79. Ryckaert J, Bossier P, D'herde K, Diez-Fraile A, Sorgeloos P, Haesebrouck F, Pasmans F. 2010. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. Fish Shellfish Immunol, 29, 648-655.
 80. Secades P, Guijarro J. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl Environ Microbiol, 65, 3969-3975.
 81. [SENAMHI] Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. Alertas Meteorológicas. Lima: [Internet], [15 diciembre 2010]. Disponible en: <http://www.senamhi.gob.pe>
 82. Sharp, G. 2003. Future climatic change and regional fisheries: a collaborative analysis. Rome. FAO. FAO Fisheries Technical Paper, N° 452: 75 pag.
 83. Siwicki A, Morand M, Fuller J, Nissen S, Kazun K, Glombski E. 2001. Influence of HMB (beta-hydroxy-beta-methylbutyrate) on antibody secreting cells (ASC) after in vitro and in vivo immunization with the anti-*Yersinia ruckeri* vaccine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet Res, 32: 491-498.
 84. Soto, D., Aguilar-Manjarrez, J., Brugère, C., Angel, D., Bailey, C., Black, K., Edwards, P., Costa Pierce, B., Chopin, T., Deudero, S., Freeman, S., Hambrey, J., Hishamunda, N., Knowler, D., Silver, W., Marba, N., Mathe, S., Norambuena, R., Simard, F., Tett, P., Troell, M. & Wainberg, A. 2008. Applying an ecosystem-based approach to aquaculture: principles, scales and some management measures. FAO Fisheries Proceedings. No. 14: 15–35.
 85. Starliper, C. 2008. General and specialized media routinely employed for primary isolation of bacterial pathogens of fishes. J Wild Dis, 44: 121-132.
 86. Stevenson R, Airdrie, D. 1984. Isolation of *Yersinia ruckeri* Bacteriophages. Appl Environ Microbiol, 47: 1201-1205.
 87. Stock I, Henrichfreise B, Wiedemann B. 2002. Natural antibiotic susceptibility and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. aldovae* and *Y. Ruckeri*. J Med Microbiol, 51: 56-69.

88. Thorsen B, Enger O, Norland S, Hoff K. 1992. Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods. *Appl Environ Microbiol*, 58, 1624-1628.
89. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesesbrouck F, Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J Fish Dis*, 30, 257-268.
90. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesesbrouck F, Chiers K. 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ*, 84, 219-28.
91. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010a. In vitro markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. *J Fish Dis*, 33: 197-209.
92. Tobback E, Hermans K, Decostere A, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010b. Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated gill arches and intestinal explants of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ*, 90, 175-9.
93. [UNEP] Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (Del inglés: United Nations Environment Programn .2010. Vital Climate Change Graphics for Latin America and the Caribbean Spetial edition for the COP 16/CMP 6, México. 22-27
94. Vladick P, Prouza A. 1990. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout in Czechoslovakia. *Vet Med Praha*, 35: 437-42.
95. Wagle A, Kulkarni Y, Patil A. 1983. Antagonistic activity of *Chainia flava* Thirum, against *Pseudomonas solanacearum*, causing brown-rot of potato in India. *Hindustan Antibiot Bull*, 25, 18-20.
96. Welch T, Wiens G. 2005. Construction of a virulent, green fluorescent protein-tagged *Yersinia ruckeri* and detection in trout tissues after intraperitoneal and immersion challenge. *Dis Aquat Organ*, 67, 267-72.
97. Wheler R, Davies R, Dalsgaard I, Garcia J, Welch T, Wagley S, Bateman K, Verner-Jeffreys D . 2009. *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. *Dis Aquat Organ*, 84, 25-33.
98. Wiens G, Glenney G, Lapatra S, Welch T. 2006. Identification of novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chemokines, CXCD1 and CXCD2: mRNA expression after *Yersinia ruckeri* vaccination and challenge. *Immunogenetics*, 58: 308-323.
99. Wiens G, Vallejo R. 2010. Temporal and pathogen-load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol*, 29: 639-647.
100. [WWF] Fundación Mundial de Vida Silvestre (Del inglés: World Wildlife Fund). 2005. Potencial impacts of global climate change on freshwater fisheries. Pag 13.

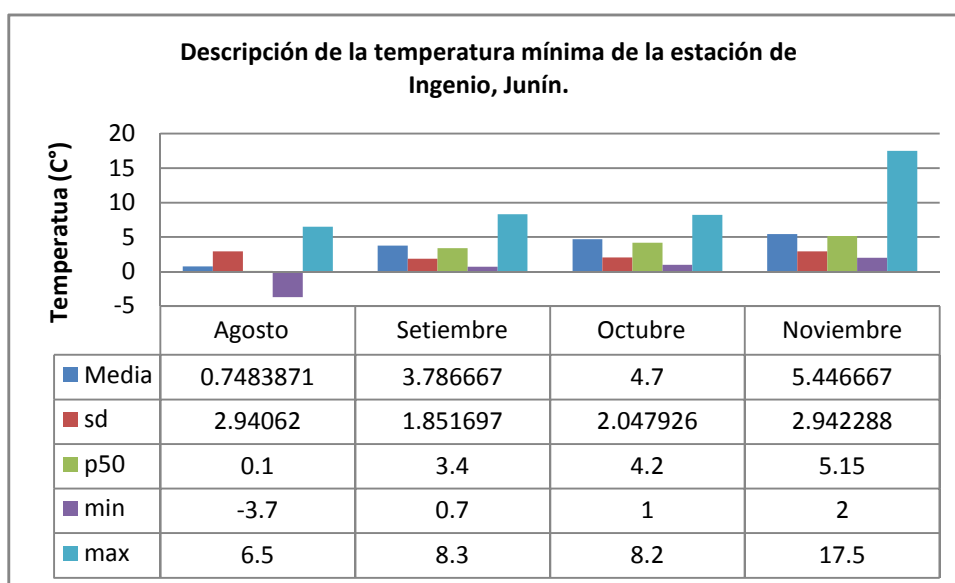
VIII APÉNDICES

APÉNDICE N° 1

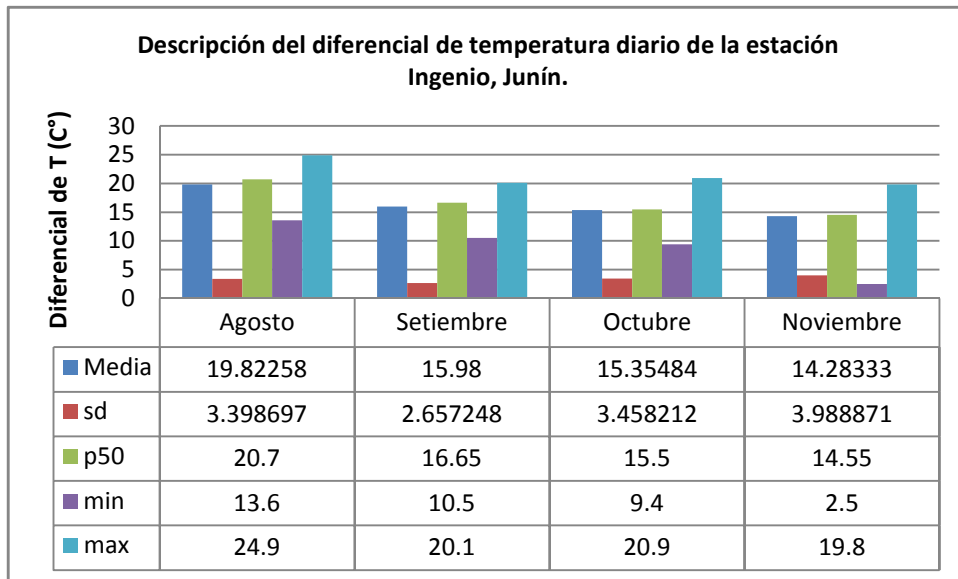
Gráfica 7. Descripción de temperatura máxima registrada por la estación Ingenio.



Gráfica 8. Descripción de temperatura mínima registrada por la estación Ingenio



Gráfica 9. Descripción del rango térmico diario de la estación Ingenio.



APÈNDICE N° 2

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Los procedimientos se realizarán con mascarilla, guantes y lentes protectores.

PREPARACIONES PREVIAS:

Búfer de Lavado: Agregar etanol 96-100% al Búfer de Lavado I y II, de acuerdo a las instrucciones de cada envase, mezclar bien. Almacenarlos a temperatura ambiente.

Preparar baño maría a 55°C.

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 250 µl de muestra* en un tubo de microcentrífuga para ser pelletizado centrifugando a 6 000 RPM por 1 minuto y medio a temperatura ambiente, eliminar el líquido sobrenadante y quedarse únicamente con el pellet.
2. Resuspender en 180 µl de Genomic Diggestion Buffer™ (incluido en el kit de Invitrogen) más 20 µl de proteinasa K (incluido en el kit de Invitrogen) para lisar las células. Dar un ligero vortex para homogenizar.
3. Incubar a 55°C por 30 minutos aproximadamente, vorteando el tubo de microcentrífuga cada 10 minutos. En caso de que la muestra no esté totalmente lisada incubar por más tiempo (hasta 4 horas de ser necesario).
4. Agregar 20 µl de RNAsa A (incluido en el kit de Invitrogen), dar un vortex e incubar por 2 minutos.
5. Agregar 200 µl del Genomic Lysis/Binding Buffer™ (incluido en el kit de Invitrogen) homogenizar bien con vortex.
6. Agregar 200 µl de Etanol al 100% y dar un vortex por 5 segundos, hasta obtener una solución homogénea.
7. Agregar 500 µl de la mezcla anterior a la Membrana de Sílica (incluida en el kit).
8. Centrifugar a 10 000 G por 1 minuto a Temperatura ambiente. Descartar el líquido del tubo y cambiar la membrana de sílica a un nuevo tubo de colección (incluido en el kit).
9. Agregar 500 µl de Solución de Lavado I preparado con anterioridad y llevar a centrifugar a 10 000 G por 1 minuto a Temperatura ambiente. Descartar el líquido del tubo y cambiar la membrana de sílica a un nuevo tubo de colección (incluido en el kit).
10. Agregar 500 µl de Solución de Lavado II preparado con anterioridad y llevar a centrifugar a 20 000 G por 3 minutos a Temperatura ambiente. Descartar el líquido del tubo y cambiar la membrana de sílica a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril y libre de nucleasas.
11. Agregar 60 µl de Buffer de Elusión (incluido en el kit) e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
12. Llevar a centrifugar a 20 000 G por 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo de microcentrífuga tendrá el ADN genómico purificado.
13. Eliminar la membrana de sílica, alicuotar en tubos de microcentrífuga de 0.5 ml estériles libres de nucleasas y almacenar el ADN genómico purificado en congelación, si su uso es inmediato a 4°C, si se desea almacenar por tiempo prolongado a -20°C.

* Colonias bacterianas resuspendidas en suero fisiológico.

APÉNDICE N° 3

PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ADN ds

Los procedimientos se realizarán con mascarilla, guantes y lentes protectores.

PREPARACIONES PREVIAS:

Solución de trabajo: Se prepara diluyendo el Quant-iT™ dsDNA HS reagent 1:200 en el búfer Quant-iT™, ambos incluidos en el kit; para un volumen de 200 µl por muestra.

Búfer Quant-iT™	199 µl x N
Quant-iT™ dsDNA HS reagent	1 µl x N

*N: En el número de tubos a utilizar, contabilizar el número de muestras a cuantificar mas los dos estándares necesarios para calibrar el fluorómetro.

Preparación de Estándares:

1. Rotular dos tubos de microcentrífuga de 0.5 ml, estériles de pared delgada (incluido en el kit), uno de ellos el Estándar 1 y el otro Estándar 2.
2. Colocar 190µl de Solución de trabajo en cada tubo de estándares.
3. En el tubo de Estándar 1, colocar 10µl de Quant-iT™ Estándar 1. Vortear de 2 a 3 segundos.
4. En el tubo de Estándar 2, colocar 10µl de Quant-iT™ Estándar 2. Vortear de 2 a 3 segundos.
5. Incubar por dos minutos a temperatura ambiente.
6. Llevar a su lectura en el Qubit™.

Preparación de las Muestras:

1. Rotular tubos de microcentrífuga de 0.5 ml, estériles de pared delgada (incluido en el kit) con la identificación de las muestras a trabajar.
2. Colocar 197µl de Solución de trabajo en cada tubo de muestras.
3. Añadir 3µl de ADN de doble hebra de la muestra en el tubo correspondiente. Vortear de 2 a 3 segundos.
4. Incubar por dos minutos a temperatura ambiente.
5. Llevar a su lectura en el Qubit™.

Lectura en el Qubit™:

1. Encender el fluorómetro y conectarlo a una computadora, con el software debidamente instalado.
2. Presionar el botón de HOME, y utilizando las flechas seleccionar la opción Quant-iT™ DNA, HS. Presionar GO.
3. Seleccionar la opción de “Run new calibration”, si antes no se han usado estándares.
4. Colocar el tubo que contiene el Estándar 1, cerrar la tapa y presionar GO. En la pantalla indicará cuando habrá realizado la lectura. Sacar el tubo.

5. Colocar el tubo que contiene el Estándar 2, cerrar la tapa y presionar GO. En la pantalla indicará cuando habrá realizado la lectura. Sacar el tubo.
6. Una vez lista la calibración insertar el tubo con la muestra, cerrar la tapa y presionar GO. La pantalla mostrará la lectura, y estos datos serán visibles en la computadora.
7. Ir a “Calculate sample concentration” y seleccionar el numero de microlitros de ADN de muestra utilizados, en este caso 3 μ l.
8. En la computadora aparecerán las concentraciones del ADN de la muestra en μ l/ml.

APÉNDICE N° 4

PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL

Los procedimientos se realizarán con mascarilla, guantes y lentes protectores.

PREPARACIONES PREVIAS:

Tener un contenedor con hielo para mantener la temperatura de los reactivos utilizados.

Rox: El rox debe diluirse con anterioridad hasta conseguir una solución de 1:10.

Rox (puro)	10 μ l
Agua libre de nucleasas	90 μ l

Mix de PCR: este debe prepararse en un tubo de microcentrífuga de 2ml de capacidad.

SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal	10 μ l	} x N
Forward primer,	0.4 μ l (200 nM conc. Final)	
Reverse primer,	0.4 μ l (200 nM conc. Final)	
ROX (Diluido 1:10)	1 μ l	
Agua libre de nucleasas	7.2 μ l	

*N: numero de muestras a trabajar, además de los controles positivos y un blanco (agua).

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar el mix de PCR en hielo hasta su uso.
2. Colocar 19 μ l de mix de PCR en tubos en tiras para PCR a tiempo real nuevos.
3. Agregar 1 μ l de ADN de la muestra y pipetear para mezclar bien.
4. Tapar los tubos debidamente para evitar evaporación.
5. Llevar la tira de tubos al termociclador.
6. Programar la computadora con el siguiente protocolo de temperaturas:
 - Incubar a 50°C por dos minutos (00.02.00)
 - Incubar a 95°C por diez minutos (00.10.00)
 - Incubar a 95°C por quince segundos (00.00.15)
 - Incubar a 60°C por un minuto (00.01.00)
 - Leer la placa
 - Ir a línea 3 por 40 veces más
 - Curva de Melting de 65.0°C a 95°C, leer cada 0.3°C manteniendo 2 segundos (00.00.02)
 - Incubar a 4.0°C indefinidamente
7. Iniciar proceso. Al finalizar, leer los resultados.

APÉNDICE N° 5

Base de Datos de los Resultados en la Prueba Bacteriológica y Molecular del Estudio en la Piscigranja “El Eden”.

	Fecha	Mes	Dx Bacterio	Dx Molecular	Dx Positivo
1	28/08/2010	0	0	1	1
2	28/08/2010	0	0	0	0
3	28/08/2010	0	0	0	0
4	28/08/2010	0	0	0	0
5	28/08/2010	0	0	0	0
6	28/08/2010	0	0	0	0
7	28/08/2010	0	0	0	0
8	28/08/2010	0	0	0	0
9	28/08/2010	0	0	0	0
10	28/08/2010	0	0	0	0
11	28/08/2010	0	1	0	1
12	28/08/2010	0	0	0	0
13	28/08/2010	0	0	0	0
14	28/08/2010	0	1	0	1
15	28/08/2010	0	0	1	1
16	28/08/2010	0	0	0	0
17	28/08/2010	0	0	0	0
18	28/08/2010	0	0	0	0
19	28/08/2010	0	0	0	0
20	28/08/2010	0	0	0	0
21	28/08/2010	0	0	0	0
22	28/08/2010	0	0	0	0
23	28/08/2010	0	0	0	0
24	28/08/2010	0	0	0	0
25	28/08/2010	0	0	0	0
26	28/08/2010	0	0	0	0
27	28/08/2010	0	0	0	0
28	28/08/2010	0	0	0	0
29	28/08/2010	0	0	0	0
30	28/08/2010	0	0	0	0
31	28/08/2010	0	0	0	0
32	28/08/2010	0	0	0	0
33	28/08/2010	0	0	0	0
34	28/08/2010	0	0	0	0
35	28/08/2010	0	0	0	0
36	28/08/2010	0	0	0	0
37	28/08/2010	0	0	0	0
38	28/08/2010	0	0	0	0
39	28/08/2010	0	0	0	0

40	28/08/2010	0	0	0	0
41	28/08/2010	0	1	0	1
42	28/08/2010	0	0	0	0
43	28/08/2010	0	0	0	0
44	28/08/2010	0	0	0	0
45	28/08/2010	0	0	0	0
46	28/08/2010	0	0	0	0
47	28/08/2010	0	0	0	0
48	28/08/2010	0	0	0	0
49	28/08/2010	0	0	0	0
50	28/08/2010	0	1	0	1
51	28/08/2010	0	0	0	0
52	28/08/2010	0	0	0	0
53	28/08/2010	0	0	0	0
54	28/08/2010	0	0	0	0
55	28/08/2010	0	0	0	0
56	28/08/2010	0	0	0	0
57	28/08/2010	0	0	0	0
58	28/08/2010	0	0	0	0
59	28/08/2010	0	0	0	0
60	28/08/2010	0	1	1	1
61	02/10/2010	1	0	0	0
62	02/10/2010	1	0	0	0
63	02/10/2010	1	0	0	0
64	02/10/2010	1	0	0	0
65	02/10/2010	1	0	0	0
66	02/10/2010	1	0	0	0
67	02/10/2010	1	0	0	0
68	02/10/2010	1	0	0	0
69	02/10/2010	1	0	0	0
70	02/10/2010	1	0	0	0
71	02/10/2010	1	0	0	0
72	02/10/2010	1	0	0	0
73	02/10/2010	1	0	0	0
74	02/10/2010	1	0	0	0
75	02/10/2010	1	0	0	0
76	02/10/2010	1	0	0	0
77	02/10/2010	1	0	0	0
78	02/10/2010	1	0	0	0
79	02/10/2010	1	0	0	0
80	02/10/2010	1	0	0	0
81	02/10/2010	1	0	0	0
82	02/10/2010	1	0	0	0
83	02/10/2010	1	0	0	0

84	02/10/2010	1	0	0	0
85	02/10/2010	1	0	0	0
86	02/10/2010	1	1	0	1
87	02/10/2010	1	0	0	0
88	02/10/2010	1	0	0	0
89	02/10/2010	1	0	0	0
90	02/10/2010	1	0	0	0
91	02/10/2010	1	0	0	0
92	02/10/2010	1	0	0	0
93	02/10/2010	1	0	0	0
94	02/10/2010	1	1	0	1
95	02/10/2010	1	0	0	0
96	02/10/2010	1	0	0	0
97	02/10/2010	1	0	0	0
98	02/10/2010	1	0	0	0
99	02/10/2010	1	0	0	0
100	02/10/2010	1	0	0	0
101	02/10/2010	1	0	0	0
102	02/10/2010	1	0	0	0
103	02/10/2010	1	0	0	0
104	02/10/2010	1	0	0	0
105	02/10/2010	1	0	0	0
106	02/10/2010	1	1	0	1
107	02/10/2010	1	0	0	0
108	02/10/2010	1	0	0	0
109	02/10/2010	1	0	0	0
110	02/10/2010	1	0	0	0
111	02/10/2010	1	0	0	0
112	02/10/2010	1	0	0	0
113	02/10/2010	1	0	0	0
114	02/10/2010	1	0	0	0
115	02/10/2010	1	0	0	0
116	02/10/2010	1	0	0	0
117	02/10/2010	1	0	0	0
118	02/10/2010	1	0	0	0
119	02/10/2010	1	0	0	0
120	02/10/2010	1	0	0	0
121	06/11/2010	2	0	0	0
122	06/11/2010	2	0	1	1
123	06/11/2010	2	0	0	0
124	06/11/2010	2	0	0	0
125	06/11/2010	2	0	0	0
126	06/11/2010	2	0	0	0
127	06/11/2010	2	0	0	0

128	06/11/2010	2	0	0	0
129	06/11/2010	2	1	1	1
130	06/11/2010	2	0	1	1
131	06/11/2010	2	0	0	0
132	06/11/2010	2	0	0	0
133	06/11/2010	2	0	0	0
134	06/11/2010	2	0	0	0
135	06/11/2010	2	0	0	0
136	06/11/2010	2	0	1	1
137	06/11/2010	2	0	0	0
138	06/11/2010	2	0	0	0
139	06/11/2010	2	0	1	1
140	06/11/2010	2	0	0	0
141	06/11/2010	2	0	0	0
142	06/11/2010	2	0	0	0
143	06/11/2010	2	0	0	0
144	06/11/2010	2	0	0	0
145	06/11/2010	2	0	0	0
146	06/11/2010	2	0	1	1
147	06/11/2010	2	0	1	1
148	06/11/2010	2	0	0	0
149	06/11/2010	2	1	0	1
150	06/11/2010	2	0	0	0
151	06/11/2010	2	0	0	0
152	06/11/2010	2	0	0	0
153	06/11/2010	2	0	0	0
154	06/11/2010	2	0	0	0
155	06/11/2010	2	0	0	0
156	06/11/2010	2	0	0	0
157	06/11/2010	2	0	0	0
158	06/11/2010	2	0	0	0
159	06/11/2010	2	0	0	0
160	06/11/2010	2	0	0	0
161	06/11/2010	2	1	0	1
162	06/11/2010	2	1	0	1
163	06/11/2010	2	0	0	0
164	06/11/2010	2	0	0	0
165	06/11/2010	2	0	0	0
166	06/11/2010	2	0	0	0
167	06/11/2010	2	0	0	0
168	06/11/2010	2	0	0	0
169	06/11/2010	2	0	0	0
170	06/11/2010	2	0	0	0
171	06/11/2010	2	0	0	0

172	06/11/2010	2	0	0	0
173	06/11/2010	2	0	0	0
174	06/11/2010	2	0	0	0
175	06/11/2010	2	0	0	0
176	06/11/2010	2	0	0	0
177	06/11/2010	2	0	0	0
178	06/11/2010	2	0	0	0
179	06/11/2010	2	0	0	0
180	06/11/2010	2	0	0	0

APÉNDICE N° 6

Base de Datos de la Lesiones Histopatológicas en el tejido Hepático, Renal y Branquial.

	Fecha	Hig_deg1	Hig_deg2	Hig_deg3	Hig_deg4	Baz_CMM	Riñ_deg	Riñ_adap	Riñ_CMM	Riñ_GRADO	Branq_infl	Branqu_adap	Branq_deg	Branq_GRADO
1	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
2	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0	2
9	28/08/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
10	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
11	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	28/08/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
13	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	2
17	28/08/2010	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
18	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
19	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
20	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2
21	28/08/2010	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2
22	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	2
23	28/08/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
24	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0

25	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2
26	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0
27	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0	2
28	28/08/2010	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
29	28/08/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
30	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
32	28/08/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	28/08/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	28/08/2010	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0	2
39	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
40	28/08/2010	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
41	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
43	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	28/08/2010	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	28/08/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	2
47	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
48	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
49	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
50	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2
51	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2
52	28/08/2010	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	1	0	2

53	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
54	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0
55	28/08/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2
56	28/08/2010	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0
57	28/08/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	1	0	2
58	28/08/2010	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
59	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
60	28/08/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	02/10/2010	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	2
62	02/10/2010	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	3
63	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3
64	02/10/2010	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0
65	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	1	3	1	0	0	2
66	02/10/2010	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	2
67	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
68	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
69	02/10/2010	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0
70	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	2
71	02/10/2010	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	1	1	2
72	02/10/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3
73	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	1	0	3
74	02/10/2010	0	0	0	1	0	1	0	0	3	0	1	0	2
75	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	3
76	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	2
77	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	0	1	2
78	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	1	0	2
79	02/10/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
80	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	2

81	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
82	02/10/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	2
84	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
85	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
87	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	3	1	1	1	3
92	02/10/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	02/10/2010	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
96	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2
98	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	3
99	02/10/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
100	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
101	02/10/2010	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	2
102	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	3	0	0	0	0
103	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	02/10/2010	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1	1	0	3
106	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	2

109	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
112	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	1	3	0	1	0	2
114	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	02/10/2010	0	0	1	0	0	1	0	1	3	0	1	0	3
118	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121	06/11/2010	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2
122	06/11/2010	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	1	0	3
123	06/11/2010	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	3
124	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	3	1	1	0	3
125	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	1	3	0	1	0	2
126	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1	1	0	2
127	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	2
128	06/11/2010	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	1	0	3
129	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	2
130	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	2
131	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
132	06/11/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3
133	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	0	1	3	1	1	0	2
134	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	2
135	06/11/2010	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0	1	0	2
136	06/11/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2

137	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	1	2	0	1	0	3
138	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2
139	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2
140	06/11/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
141	06/11/2010	0	0	0	1	0	1	1	1	2	1	1	0	3
142	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	1	2	1	1	0	2
143	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0
144	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	2
145	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0
146	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	2	0	1	0	4
147	06/11/2010	0	0	0	1	1	1	0	1	2	0	1	0	2
148	06/11/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
149	06/11/2010	0	0	1	0	0	0	1	0	2	1	1	0	2
150	06/11/2010	0	0	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	3
151	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3
152	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	1	2	1	0	1	3
153	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	1	0	3
154	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	1	1	2	1	1	0	2
155	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	3	1	1	0	2
156	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	2
157	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	2
158	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	2
159	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	2
160	06/11/2010	0	1	0	0	1	1	1	0	2	1	1	0	2
161	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	2	0	1	0	2
162	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	0	1	2	1	1	0	2
163	06/11/2010	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0
164	06/11/2010	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

165	06/11/2010	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3
166	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	2
167	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	1	3
168	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	3
169	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	3
170	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0
171	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	3
172	06/11/2010	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	3
173	06/11/2010	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1	1	0	3
174	06/11/2010	0	0	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	2
175	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3
176	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0
177	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0
178	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	0	0	2
179	06/11/2010	0	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	3
180	06/11/2010	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3

APÉNDICE N° 7

Base de Datos de los Resultados Histopatológicos para el Tejido Estomacal y Cecal

	Fecha	Est_infl	Est_deg	Est_adap	Est_CGE	Est_GRADO	Cieg_infl	Cieg_deg	Cieg_adap	Cieg_GRADO
1	28/08/2010	0	0	0	0	0	1	0	0	2
2	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	28/08/2010	0	1	0	0	3	0	0	0	0
9	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	0	2
10	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	28/08/2010	0	1	1	0	3	0	0	0	0
13	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	28/08/2010	0	1	0	0	2	0	0	0	0
20	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	0	2
21	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	2
22	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	1	2
24	28/08/2010	0	1	0	0	2	0	0	1	2

25	28/08/2010	0	0	0	1	2	0	1	1	2
26	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	28/08/2010	0	0	0	0	2	0	1	0	2
28	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	0	1
29	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	2	2
30	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	28/08/2010	0	0	0	0	0	1	0	0	2
32	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	28/08/2010	0	1	0	0	3	0	0	0	0
39	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	0	2
40	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	28/08/2010	0	1	1	0	3	0	0	0	0
43	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	28/08/2010	0	1	0	0	2	0	0	0	0
50	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	0	2
51	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	2
52	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0

53	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	1	2
54	28/08/2010	0	1	0	0	2	0	0	1	2
55	28/08/2010	0	0	0	1	2	0	1	1	2
56	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	28/08/2010	0	0	0	0	2	0	1	0	2
58	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	0	1
59	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	1	2	2
60	28/08/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	02/10/2010	0	0	1	0	1	1	0	1	1
62	02/10/2010	1	0	0	1	3	0	0	1	2
63	02/10/2010	1	0	0	1	4	0	0	1	2
64	02/10/2010	1	1	1	1	3	0	0	1	3
65	02/10/2010	1	0	1	1	4	1	0	1	3
66	02/10/2010	1	0	1	1	3	0	0	0	0
67	02/10/2010	1	0	1	1	3	0	0	0	0
68	02/10/2010	1	0	1	1	2	0	0	0	0
69	02/10/2010	0	0	1	1	2	0	0	1	2
70	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	02/10/2010	1	0	1	1	2	1	0	1	2
72	02/10/2010	0	1	1	1	2	1	0	1	3
73	02/10/2010	0	0	1	1	1	0	0	0	0
74	02/10/2010	1	0	1	1	2	0	0	1	2
75	02/10/2010	1	0	0	1	2	0	0	0	0
76	02/10/2010	1	0	0	1	2	0	0	1	2
77	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	1	2
78	02/10/2010	0	1	0	1	2	0	0	1	2
79	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	02/10/2010	1	0	1	1	3	1	0	1	3

81	02/10/2010	0	0	1	1	2	0	0	1	2
82	02/10/2010	1	1	0	1	2	0	0	0	0
83	02/10/2010	1	0	0	1	2	1	0	1	3
84	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	1	2
86	02/10/2010	0	0	0	0	0	1	0	1	2
87	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	02/10/2010	1	0	1	1	3	0	0	0	0
92	02/10/2010	1	0	1	1	3	0	0	1	2
93	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	1	2
96	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	1	1
97	02/10/2010	0	0	0	1	2	0	0	0	0
98	02/10/2010	0	0	0	1	2	0	0	1	1
99	02/10/2010	0	0	0	1	1	0	0	0	0
100	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
102	02/10/2010	0	0	0	1	1	0	0	1	1
103	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	02/10/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
106	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
107	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	02/10/2010	1	0	0	1	2	0	0	0	0

109	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
112	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	02/10/2010	1	0	0	1	2	0	0	0	0
118	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
119	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	02/10/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121	06/11/2010	1	0	1	1	2	1	0	1	2
122	06/11/2010	1	1	0	1	2	0	0	0	0
123	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	0	0
124	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
125	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	1	2
126	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
127	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	06/11/2010	1	0	1	1	3	0	0	0	0
129	06/11/2010	0	0	0	1	2	0	0	0	0
130	06/11/2010	1	0	0	1	3	1	0	0	2
131	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
132	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
133	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
134	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
135	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	0	0
136	06/11/2010	1	1	0	0	2	0	0	0	0

137	06/11/2010	1	0	0	0	3	0	0	0	0
138	06/11/2010	1	0	0	0	3	1	0	1	2
139	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
140	06/11/2010	1	0	1	1	3	0	0	0	0
141	06/11/2010	0	1	0	1	3	0	0	1	2
142	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	1	2
143	06/11/2010	0	0	0	1	2	0	0	0	0
144	06/11/2010	0	0	0	1	2	0	0	0	0
145	06/11/2010	1	0	1	0	2	0	0	0	0
146	06/11/2010	1	0	0	1	2	0	0	0	0
147	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
148	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
149	06/11/2010	0	0	1	1	2	0	0	0	0
150	06/11/2010	1	0	1	1	3	1	0	0	2
151	06/11/2010	1	0	1	1	3	0	0	0	0
152	06/11/2010	0	1	1	1	3	0	0	0	0
153	06/11/2010	0	0	1	1	2	0	0	0	0
154	06/11/2010	1	1	1	0	3	0	0	0	0
155	06/11/2010	1	1	1	1	3	0	0	0	0
156	06/11/2010	1	1	1	1	2	0	0	0	0
157	06/11/2010	1	1	1	1	3	0	0	0	0
158	06/11/2010	0	1	0	1	3	0	0	0	0
159	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
160	06/11/2010	0	1	1	1	2	0	0	0	0
161	06/11/2010	0	1	1	1	2	0	0	0	0
162	06/11/2010	0	0	1	1	2	0	0	0	0
163	06/11/2010	0	0	0	1	2	0	0	0	0
164	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	0	0

165	06/11/2010	1	0	0	1	3	0	0	0	0
166	06/11/2010	0	1	1	1	2	0	0	0	0
167	06/11/2010	0	1	1	1	2	0	0	0	0
168	06/11/2010	0	0	0	1	2	0	0	0	0
169	06/11/2010	0	0	1	1	2	0	0	0	0
170	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	0	0
171	06/11/2010	0	1	1	1	2	1	0	0	3
172	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	0	0
173	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
174	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
175	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
176	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
177	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
178	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	0	0
179	06/11/2010	0	1	0	1	2	0	0	0	0
180	06/11/2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0