Informe sobre Necropsia

Fabián Shalóm

Cátedra de Ictiopatología

Tecnicatura en Acuicultura - C.R.U.B. - U. N. del Comahue

Casilla de Correo 1336 - CP 8400 - S .C. de Bariloche

Indice

1 Introducción **2**

2 Envío de Muestras **2**

3 Evaluación de los Antecedentes del Caso (Anamnesis) **2**

3.1 Peces 2
3.2 Contenedores 2
3.3 Origen y Calidad del Agua 3
3.4 Pretratamientos del Agua 3
3.5 Alimento y Alimentación 3
3.6 Acciones de Manejo (Muestreos y Clasificaciones) 4
3.7 Historia de la Mortalidad 4
3.8 Comportamiento de los Peces 4

4 Examen del Animal Vivo y su Sacrificio **4**

5 Examen Externo del Organismo **4**

6 Examen de los Órganos Internos **5**

7 Estudio Virológico **5**

8 Estudio Bacteriológico **5**

9 Estudio Parasitario **6**

10 Estudio de los Resultados **6**

11 Bibliografía **6**

1 Introducción

La necropsia está constituida por una serie de pasos a seguir a fin de acercarse con la mayor certeza posible a la o las razones por las cuales un organismo ha fallecido. Esta causa puede ser patológica, por razones ambientales, por tóxicos, por exceso de estrés, etcétera. Para su análisis crítico se debe conocer los datos previos de los organismos, ya sea edad, sexo, calidad y cantidad de alimento que recibieron, contenedores donde se estabularon, etcétera. Es decir se debe realizar una Historia Clínica o Anamnésis. A partir de esta se realizan una cantidad de estudios diferentes según lo que se sospecha encontrar y en caso de no tener sospechas se realizan exámenes generales a fin de encontrar alguna causa que justifique la muerte de los organismos.

2 Envío de Muestras

El envío de las muestras para su análisis en el laboratorio es un paso fundamental para llegar a un diagnóstico certero. En el envío de las muestras se deben tener en cuenta la cantidad de organismos y la calidad de los mismos. La cantidad debe ser representativa en relación al número total de los peces que se están cultivando, la cantidad de estos que se sospecha que están infectados y a su vez la cantidad de estos que han fallecido (mortalidad). La calidad de las muestras también es fundamental ya que de poco sirve un organismo fallecido hace varias semanas, si se buscan bacterias, ya que el ataque bacteriano *post-mortem* es quizás mayor que el ataque que dió origen a la muerte del mismo. Por lo tanto, es preferible enviar peces vivos con los síntomas presentes o recientemente muertos, intentando a su vez de minimizar los procesos de autólisis evitando la exposición al calor y a la luz.

3 Evaluación de los Antecedentes del Caso (Anamnesis)

Para comenzar los estudios de laboratorio se debe tener conocimiento de la mayor cantidad posible de datos previos de los organismos, el tipo de cultivo, las normas de seguridad sanitaria que se respetan en el centro de cultivo, el alimento que se utiliza, las prácticas de manejo que se les aplican, etcétera. Con este fin, durante la cursada de la Cátedra de Ictiopatología, hemos visitado en Centro de Salmonicultura Bariloche. En este se han observado los siguientes puntos: (Con fines académicos, en este caso se intenta caracterizar de una manera general la piscicultura ya mencionada, sin así buscar patología alguna)

3.1 Peces

Los organismos cultivados en este criadero son principalmente Trucha Arco iris ***(Oncorhynchus mykiss)***, las cuales son descencientes de organismos del mismo criadero sin incluir material genético de otro origen. A su vez los tamaños presentes varían desde ovas en estado de incubación, hasta reproductores de tamaños mayores a dos kilogramos de peso. El ciclo de producción es completo produciéndose las ovas que van a ser luego comercializadas o engordadas en el mismo centro de cultivo.Los peces de mayor longevidad son los reproductores cuya edad varía entre los dos y seis años de vida. El resto de los peces estabulados no poseen una edad mayor a dos años.

En este establecimiento los peces al pasar la smoltificación no son transladados al agua marina sino que se mantienen en las mismas condiciones de agua dulce.

3.2 Contenedores

El mencionado establecimiento posee contenedores para todos los estadíos de los salmónidos, desde su Incubación, Eclosión y Alevinaje, Engorde y Reproducción. Debido a las diferencias que poseen entre estos, a continuación se van a caracterizar cada uno por separado.

Incubación

Los contenedores para la incubación son verticales. El ingreso del agua es por el extremo inferior y está resguardado por una rejilla metálica para evitar el paso de las ovas. El egreso del agua se encuentra en el extremo superior por rebalse. La forma es cilíndrica y mide unos 30cm de diámetro por 50cm de alto. Esta se encuentra dentro de una Sala de Incubación, con paredes de concreto y techo de chapa. El agua que ingresa a la misma tiene como pretratamientos cribas de diferentes espesores y un filtro de piedras. Estas incubadoras verticales tienen mas de cinco años de uso, aunque varía la edad entre unas y otras.

Eclosión y Alevinaje

La eclosión y el alevinaje de los organismos de cultivo se realizan en los mismos contenedores. Estos son de concreto, y están ubicados dentro de la Sala de Incubación, con los mismos pretratamientos del agua que los incubadores. Sus medidas son aproximadamente dos metros de largo, veinte centímetros de alto y treinta centímetros de ancho. Cada uno de estos tiene una entrada de agua individual la cual fue contruída hace poco tiempo, ya que antes tenía una disposición en rosario. La entrada de agua se ubica en un extremo, circula horizontalmente y se elimina por el extremo opuesto.

Estos contenedores tienen mas de diez años de uso y el mantenimiento que se les realiza año tras año es pintarlos con pintura de pileta a fin de evitar filtraciones.

También hay contenedores para Alevinaje en el exterior de la Sala de Incubación, estos son circulares, de un metro de diámetro por un metro de profundidad, el agua ingresa por el extremo superior, promoviendo un movimiento circular del agua y egresa por el extremo inferior. El material de los mismos es Fibra de Vidrio y poseen tapas algunas del mismo material o de media sombra.

Engorde y Reproducción

Estos contenedores están ubicados en el exterior, por lo tanto están en contacto con diferentes tipos de predadores, que pueden causar heridas, que a su vez dan origen a vías de ingreso de organimos patógenos. Las medidas varían pero aproximadamente tienen un largo de hasta 30m, un ancho de hasta 3m, y una profundidad de hasta 1m. El ingreso y egreso del agua es similar a los contenedores para Alevinaje.

Estos contenedores tienen muchos años de vida y el mantenimiento que se les está realizando es casi nulo, muchas paredes están resquebrajándose, poseen pérdidas, etcétera.

3.3 Origen y Calidad del Agua

El agua que se utiliza en el centro de producción en cuestión, es proveniente del Arroyo Gutierrez, el cual a su vez proviene del Lago Gutierrez. La misma es agua dulce, cuyos valores fisico-químicos históricamente fueron favorables para el cultivo de salmónidos, ya que se trabajó mas de treinta años produciendo truchas sin grandes inconvenientes en este sentido. Actualmente existe un barrio aguas arriba (Villa Los Coihues), lo cual puede modificar a futuro la calidad y cantidad de agua que el arroyo recibe.

3.4 Pretratamientos del Agua

Los pretratamientos del agua son muy básicos ya que la calidad de la misma es bastante buena. Antes del ingreso del agua al sistema de cultivo hay varias **Crivas** de tamaños variables para evitar el ingreso de hojas, ramas y demás material de gran tamaño. Por otro lado y mas adelante, para los circulares de alevinaje, hay una **Pileta de Decantación** para eliminar el material en suspensión. En la Sala de Incubación el agua ingresa siendo previamente tratada en un **Filtro de Piedras** que elimina gran cantidad del material el suspensión, siendo este método mas eficaz que la Pileta de Decantación.

En el caso de las piletas de engorde y reproducción, no existe pretratamiento alguno mas que las **Cribas** para hojas y ramas.

3.5 Alimento y Alimentación

El alimento utilizado es producido en Alimentos del Pilar S.A. (Pilar - Buenos Aires), y es marca Ganave. La calidad del mismo, según los productores que lo utilizan, no es la mejor pero tampoco es del todo mala (Beveraggi com. pers., 2002; Bringas com. pers., 2002; Baez com. pers., 2002).

Los organismos están siendo alimentados según los pedidos de compra que van surgiendo, por lo cual hay gran cantidad de peces subalimentados, entre ellos los reproductores. Esto puede dar origen a una disminución de la actividad del sistema inmune y producir una mortalidad importante.

3.6 Acciones de Manejo (Muestreos y Clasificaciones)

Las acciones de manejo se realizan cada vez que se presenta la necesidad, por lo tanto depende de diferentes factores, entre otros la cantidad de alimento que se les está suministrando. Es decir mientras menor cantidad de alimento se les esté dando a los peces, se obtiene un menor crecimiento y una menor dispersión, por lo tanto se requiere menor cantidad de clasificaciones. A su vez esto depende de las exigencias del mercado, a medida que aumentan los pedidos se aumenta la alimentación y se aumentan las clasificaciones.

Todas las acciones de manejo se realizan manualmente, debido a que este centro está desprovisto de Contadores, Clasificadores y otros aparatos para un manejo automatizado. Dependiendo del tipo de muestreo o clasificación, los fármacos que se utilicen. En los casos que se utilizan mayor cantidad de químicos, son los desoves, en los cuales se utiliza un anestésico (Benzocaína) previo al manejo, y luego se realiza un baño con Verde de Malaquita, para evitar una colonización por hongos. En contraposición a esto, las clasificaciones a menudo se realizan sin anestésico, ni Verde de Malaquita.

3.7 Historia de la Mortalidad

Las mortalidades que se observan en el Centro de Salmonicultura, por lo general, son bajas. En el caso de los desoves se observa una mortalidad del 10% acumulado al fin de cada temporada.

Por otro lado existe un lote de peces de dos años de edad cuya alimentación es deficiente desde la primer clasificación que se les realizó. Estos peces actualmente pesan aproximadamente 100g y en este lote existe una mortalidad permanente frente a cada acción de manejo, e incluso cuando estas no se realizan.

3.8 Comportamiento de los Peces

Los peces, en general, no tienen aspecto externo de estar invadidos por organismos patógenos de algun tipo. En el contenedor de reproductores siempre hay algunos organismos con hongos y colonias bacterianas en las aletas, en la cabeza, en el pedúnculo caudal, etc. Estos organismos cuando se encuentran en un estado excesivamente deficiente, se eliminan. Los organismos muertos en algunos casos se entierran, y en otros casos se utilizan para alimentar a los perros que cuidan el criadero. Los peces que están moribundos o muertos en cualquiera de los piletones se extraen y se eliminan.

4 Examen del Animal Vivo y su Sacrificio

El examen del animal vivo puede dar mucha información al ictiopatólogo, tanto su aspecto externo, como su comportamiento pueden ayudar a descubrir la causa por la cual se está produciendo la mortalidad, o dar indicios para sospechar de algún tipo de patología. Por ejemplo las colonias bacterianas externas de flavobacterias son típicamente de coloración amarillenta o anaranjada.

Se debe tener en cuenta y observar el comportamiento del organismo frente a los demás organismos, la natación si es normal, errática o letárgica, si se queda quieto en superficie o en el fondo del estanque, si sube a superficie a tomar aire, etcétera.

Por otro lado el Sacrificio de los peces debe realizarse de forma tal que no se alteren las muestras que van a ser estudiadas porteriormente. Si estamos buscando un parásito que se aloja en el cerebro, y el sacrificio se realiza golpeando al pez en la cabeza, puede que el cerebro quede destruído a punto tal de no servirnos como muestra.

5 Examen Externo del Organismo

El primer examen a realizarse es la evaluación del aspecto externo del organismo. En este se deben observar el estado de los ojos, las aletas, la prescencia de hemorragias, parásitos externos, colonias bacterianas, abultamiento abdominal, lesiones externas producidas por otros peces, pájaros o el mismo manejo, etcétera.

En este momento se debe considerar que algunos aspectos del organismo que pueden parecer las causas de su muerte, y ser producto ocasionadas luego de que el organismo ya estaba fallecido (lesiones *post-mortem*). Por ejemplo pueden haber rasgos de canibalismo por parte de los demás organismos de la misma especie o aves cuando el pez se encontraba flotando en superficie.

También se pueden cortar los opérculos a fin de dejar las branquias visibles, para examinar su color y realizar cortes a fin de observarlos en microscopio. En este corte se pueden observar gran cantidad de agentes patógenos.

En caso de que se decida realizar análisis hematológico o de materia fecal, se deben tomar las muestras en este momento, siempre y cuando el estado de la muestra lo permita.

En el momento en que se termina de estudiar el organismo externamente, se tomaron todos estos datos por escrito y demás; se puede comenzar con las incisiones a fin de tomar muestras para los diferentes análisis.

6 Examen de los Órganos Internos

A fin de realizar una evaluación de los órganos internos y la correspondiente toma de muestras, se realiza una incisión en la zona ventral del organismo, desde el ano hasta poco antes de la base de los opérculos. Allí se corta hacia dorsal, y luego hacia posterior, completando el corte del filet. En este caso debemos llegar a obtener que el pez apoyado sobre uno de sus flancos y con el filet extraído, nos deje observar sus órganos internos.

Una vez abierto se debe observar tamaño, forma y color del bazo, el riñon, el hígado, el corazón, las gónadas (y también su estadío de desarrollo). Por otro lado se deben estudiar la prescencia o ausencia de ascitis (líquido en la cavidad abdonimal), y a su vez si esta ascitis es de líquido transparente o sanguinoliento. También debe comprobarse la existencia de hemorragias en los músculos, nódulos en los órganos, parasitos musculares y del sistema digestivo.

Luego de realizada toda la observación, análisis primario y toma de datos por escrito se comienza la toma de muestras para los demás estudios.

7 Estudio Virológico

Dependiendo de los síntomas encontrados y los virus que se cree que pueden estar presentes, se realiza la toma de muestras de los diferentes órganos. Estos pueden ser evaluados por el test de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), Radioinmunoensayo (RIA), o Inmunofluorescencia (IFAT), a partir de preparados de los diferentes órganos. Otro método de examinación de la prescencia de un virus puede ser mediante un cultivo en líneas celulares determinadas dependiendo del virus que se busca. A su vez los métodos de ELISA, RIA e IFAT pueden ser directos, si se buscan los antígenos, o indirectos en los casos que se buscan los anticuerpos que el pez produce en reacción a la aparición del antígeno.

En los cultivos celulares se puede determinar la prescencia o ausencia del virus patógeno por medio de la visualización del efecto citopático. Existen diferencias entre los efectos citopáticos que de los agentes etológicos producen. Luego de esto en muchos casos se debe aislar el virus, detro de un grupo de diferentes organismos que se encuentran en el cultivo celular.

8 Estudio Bacteriológico

En el estudio bacteriológico se busca llegar a observar el organismo patógeno o diferentes caracterizaciones para tener mayor o menor grado de certeza de estar frente al mismo. En el primer caso se pueden realizar cultivos celulares, cuyo inóculo sea proveniente de branquias, bazo, riñon, hígado u otro órgano en donde se está alojando el organismo. En estos luego del aislamiento se puede observar el efecto citopático producido por el mismo y a su vez realizar preparados para microscopía en donde se pueda encontrar el patógeno. En el segundo de los casos, se pueden realizar improntas de diferentes órganos, realizar prepadados directamente de los órganos, o otro método que nos permitirá observar el tipo de tinción que adopta frente a diferentes sustancias químicas (Gram, Acridine Orange, Azul de Toluidina, etc.), la motilidad u otras características del patógeno que nos acerque con una mayor certeza al organismo que se sospecha, o eliminar esta opción como hipótesis.

Por otra parte se pueden utilizar métodos serológicos (ELISA, IFAT o RIA) a fin de encontrar los anticuerpos que el organismo produce como reacción inmunológica frente a la bacteria patógena. Estos métodos si bien son mas rápidos que un cultivo no son concluyentes, sino que el método para tener una certeza total de la prescencia del patógeno es el aislamiento en el cultivo y su observación a microscopio.

9 Estudio Parasitario

Debido a la naturaleza de los parásitos, estos suelen encontrarse en el tracto digestivo, las cavidades oculares, las laminillas branquiales, etcétera. En caso de estar buscando organismos parasitarios, las muestras que se deben tomar son las siguientes:

Parasitos del Tracto Digestivo

Las muestras para la observación de estos parásitos pueden tomarse realizando una incisión del tracto digestivo poco antes del ano, y otra luego del estómago. En este corte de intestino, se puede cortar una de las paredes, abriéndolo y pudiéndose observar así en lupa o realizando aplastados de una pequeña porción de estos para microscopía.

Parasitos de las Cavidades Oculares

La toma de muestra en este caso se obtiene mediante la incisión con bisturí, extrayendo el ojo completo. Allí se pueden separar todas las partes internas del orbital, las cuales pueden observarse en lupa o microscopio.

Parasitos Branquiales

Algunas algas microscópicas poseen estructuras punzantes las cuales al pasar por las branquias quedan atrapadas. Esto a su vez produce a su vez una inflamación de las laminillas branquiales disminuyendo en gran medida la superficie de contacto del agua con el aire para permitir el intercambio gaseoso del pez ([Havrylenko 01]).

Para la toma de muestras de los organismos parasitarios de las branquias de peces, los cuales pueden ser algas entre otros tantos, se corta un arco branquial completo y se puede observar en lupa. También se puede realizar un aplastado de las laminillas branquiales, sin el arco, para observarlo con un mayor aumento en microscopio.

10 Estudio de los Resultados

A partir de los resultados obtenidos en todos los exámenes que se realizan un grupo de muestras (Virología, Bacteriología, Parasitología, etc.) se pueden encontrar varios organismos patógenos en diversos órganos. Estos organismos pueden haber atacado a la muestra provocándole el fallecimiento (si la muestra murió en el criadero), haber invadido la misma cuando esta estaba ya debilitada siendo solamente un patógeno secundario o haber accedido al cuerpo luego de la muerte del mismo.

Cuando el estudio de la totalidad de las muestras tomadas y sus resultados, además de la anamnesis y otros parámetros se llega al veredicto final. El mismo no siempre es totalmente certero ya que depende de la calidad y cantidad de las muestras enviadas, de los exámenes realizados, de el enfoque que se le dio al estudio, y de que se tenga conocimiento de la patología previamente.

Luego de esto es que se deciden las acciones de manejo a realizar. Estas dependen principalmente del organismo patógeno que se encuentre, del tamaño de los peces, de la legislación vigente, de las exigencias del mercado comprador, y demás consideraciones. Las acciones pueden variar desde realizar baños con algún fármaco o la aplicación dosis mediante la alimentación, hasta la eliminación del lote completo y su incineración.

11 Bibliografía

[Exopol 02] **Exopol** (2002) *Toma y Envío de Muestras* - http://www.exopol.com/micro/toma.html

[Havrylenko 01] **Havrylenko M.** (2001) *Algas perjudiciales para Cultivos de Peces* - Apuntes de la Cátedra de Botánica Aplicada a la Acuicultura - C.R.U.B. - U.N.C.

[Hammell 98] **Hammell K.L.** (1998) *Measuring Disease in the Field* - Can. Aqua. Inst. - Fish Health Course - Puerto Montt (Chile)

[I.N.T.A.] **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (I.N.T.A.)** *Técnica de Necropsia* - Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado - Grupo de Sanidad Animal de Balcarce - http://www.inta.gov.ar/crbsass/balcarce/GSA/necropsia.htm

[Noguera 02] **Noguera P.** (2002) *Necropsia* - Apuntes de la Cátedra de Ictiopatología - C.R.U.B. - U.N.C.

[Noguera 02b] **Noguera P.** (2002) *Diagnóstico de las Enfermedades Virales* - Apuntes de la Cátedra de Ictiopatología - C.R.U.B. - U.N.C.