



Archivos de Medicina Veterinaria
ISSN: 0301-732X
archmv@uach.cl
Universidad Austral de Chile
Chile

CUBILLOS, V.; SUAREZ, D.; ENRIQUEZ, R.; ALBERDI, A.; MONRAS, M.
Caracterización clínica y aspectos lesionales macro y microscópicos de la leucemia linfoblástica en
salmones y truchas de cultivo
Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 32, núm. 2, 2000
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

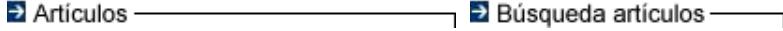
Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013740009>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

 [Inicio Web Revistas](#)

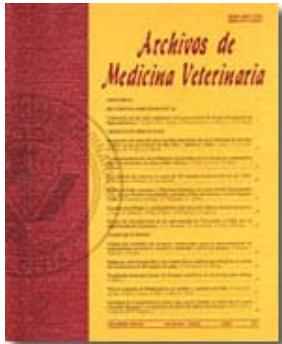
 [Web Biblioteca](#)  [Contacto](#)

Revistas Electrónicas UACH

[Artículos](#) [Búsqueda artículos](#)

[Tabla de contenido](#) [Anterior](#) [Próximo](#) [Autor](#) [Materia](#) [Búsqueda](#) [Inicio](#) [Lista](#)



Archivos de medicina veterinaria

ISSN 0301-732X *versión impresa*

 [Como citar este artículo](#)

 [Aregar a favoritos](#)

 [Enviar a e-mail](#)

 [Imprimir HTML](#)

Arch. med. vet. v.32 n.2 Valdivia 2000

Caracterización clínica y aspectos lesionales macro y microscópicos de la leucemia linfoblástica en salmones y truchas de cultivo

Clinic and Pathologic Characterization of the Lymphoblastic Leukemia in Culture's salmonids

V. CUBILLOS¹, M.V., Ph.D; D. SUAREZ, M.V.; R. ENRIQUEZ, M.V., Dr. Med. Vet.;
A. ALBERDI, T.M.; M. MONRAS, T.M.

¹ Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

Aceptado: 22.08.2000.

* Proyecto FONDECYT 1960501, Chile.

SUMMARY

In order to determine the types of gross and microscopic lesions in Salmonid fish with Lymphoblastic Leukemia in the X Region, the location and degree of severity amongst the different kinds of Salmonids and the relationship with the presence of the microsporidium *Nucleospora salmonis*, were analysed in 113 *O. kisutch*, 100 *S. salar*, 89 *O. mykiss* and 13 *O. tshawytscha*. Furthermore, histologically positive samples to Lymphoblastic Leukemia, from kidney, spleen, liver, pancreas, piloric caeca, eye, ovary and heart samples were analysed.

The histological study showed 5.7% of positive cases in fishes with Lymphoblastic Leukemia, characterised by edged location, dark skin, and pale gills. In the atlantic salmon (*S. salar*), the bilateral exophthalmos and the presence of haemorrhages in the base of fins were more emphasised,. Internally, the fish showed rhinomegaly and pale liver. Rainbow trout (*O. mykiss*) showed 40.0% of splenomegaly and the atlantic salmon (*S. salar*) showed a 33.3% of abnormal coloration in muscle and piloric caeca.

The most affected organs with Lymphoblastic Leukemia in all the species under study were kidney, spleen and with kidney and spleen as the principal affected organs association.

Microscopically, all the kidneys showed lymphoblastic cells infiltration diagnosed in 62.5% of the analysed samples. The rainbow trout (*O. mykiss*) showed severe tubular necrotic alterations and in the atlantic salmon (*S. salar*), a marked inflammatory reaction was observed. Liver, spleen, pancreas, piloric caeca, eye, ovary and heart were also affected by lymphoblastic cell infiltration, with cellular and nuclear pleomorphism. On the other hand, *Nucleospora salmonis* was detected in renal and splenic tissue in the coho salmon (*O. kisutch*), and in the lymphoblastic cells of the atlantic salmon (*S. salar*).

Palabras claves: Leucemia Linfoblástica, *Nucleospora salmonis*, Leucemia Plasmocitoidea

Keywords: Lymphoblastic Leukemia, *Nucleospora salmonis*, Plasmacytoid Leukemia

INTRODUCCION

En la actualidad Chile constituye el segundo productor mundial de Salmonídeos en confinamiento, alcanzando durante 1997 la cifra récord de 160.158 toneladas netas exportadas, siendo el salmón congelado y fresco los productos de mayor importancia comercial en relación con las exportaciones. Continuando con la tendencia tradicional de los mercados del salmón chileno, Estados Unidos y Japón se mantienen como los principales compradores, absorbiendo alrededor del 30% y 60% de la exportación nacional respectivamente ([Méndez, 1996](#)).

La intensificación de la producción, a fin de satisfacer los requerimientos del mercado internacional, ha estado aparejada de una serie de factores limitantes para la industria salmonera, es así como hoy en día, las ventajas comparativas del punto de vista sanitario de Chile como país libre de las principales enfermedades infecciosas, se ha ido perdiendo paulatinamente. En los últimos años se han reportado en el país enfermedades nuevas, de gran impacto en la producción desde el punto de vista sanitario, debido principalmente a la condición conocida como Síndrome Rickettsial Salmonídeo y en forma secundaria a la Enfermedad Bacteriana del Riñón. Una condición diagnosticada en forma importante en la década del '90 lo ha constituido la L. Plasmocitoídea, entidad de carácter neoplásico responsable de importantes pérdidas económicas en salmones y truchas. Esta enfermedad también es conocida como Anemia Marina por los productores de la British Columbia, Canadá, siendo una entidad responsable de grandes pérdidas económicas y alta mortalidad en salmones chinook (*O. tshawytscha*) ([Newbound y Kent, 1991a](#)). Dicha patología evidencia masiva infiltración de células sanguíneas inmaduras en todos los órganos esenciales ([Kent y col., 1990](#)). Esta afección ha sido caracterizada como una proliferación e infiltración de plasmoblastos en los órganos viscerales y tejido retrobulbar del pez ([Eaton y Kent, 1992](#)). Al respecto, cabe mencionar que una enfermedad similar fue descrita en salmones chinook cultivados en agua dulce en California y Washington, la cual se asoció con la presencia de un protozoo del tipo microsporidio denominado *Nucleospora salmonis* ([Hedrick y col., 1990; Morrison y col., 1990; Docker y col., 1997](#)).

En la actualidad, en la X Región se han observado cuadros con signología similar a la L. Plasmocitoídea descrita por [Kent y col. \(1990\)](#), apreciándose exoftalmia, ascitis moderada, tumefacción renal y elevada mortalidad. Este cuadro observado en Chile y denominado como L. Linfoblástica correspondería con la L. Plasmocitoídea diagnosticada en el Hemisferio Norte ([Enríquez y col., 1998](#)).

La etiología de la L. Linfoblástica no ha sido determinada con claridad, sin embargo observaciones y estudios de transmisión indican claramente que es causada por un agente infeccioso ([Kent y col., 1990](#); [Kent y Dawe, 1990](#); [Kent y col., 1991](#)). Además, la transmisión experimental de la enfermedad entre diferentes especies y géneros, permite suponer que ésta es causada por un microorganismo patógeno ([Eaton y Kent, 1992](#)). Al respecto, algunas investigaciones señalan que el agente de la enfermedad sería un nuevo retrovirus denominado Virus de la Leucemia del Salmón (SLV) ([Eaton y Kent, 1992](#)), además, estudios efectuados en salmón chinook (*O. tshawytscha*) indican que la etiología de esta enfermedad se debería, al menos en parte, a SLV ([Eaton y col., 1994](#)).

En cuanto a los agentes no víricos, incluyendo los parásitos, estos actuarían como cofactores o promotores de virus inductores de neoplasias. Posiblemente *Nucleospora salmonis* es un importante cofactor que promueve la replicación del virus oncogénico ([Kent y col., 1991](#); [Kent, 1992](#)). *N. salmonis* es un parásito intracelular obligado que tiene un tamaño aproximado de 1 x 2 mm, observándose al microscopio óptico como un cuerpo esférico eosinofílico en el interior del núcleo de las células huésped. [Chilmonczyk y col. \(1991\)](#) dividen su ciclo en etapas de merontes, esporontes y esporas, estando todas ellas en contacto directo con el nucleoplasma de la célula parasitada. Las esporas son Gram (+), poseen una fina exospora y una endospora poco diferenciada ([Elston y col., 1987](#); [Hedrick y col., 1990](#); [Hedrick y col., 1991](#)).

Si bien infecciones por *N. salmonis* son frecuentemente observadas en peces con L. Plasmocitoídea y los cambios patológicos asociados a infecciones con el microsporidio son similares a las infecciones reportadas para la misma, la asociación entre estos es desconocida, debido a que la transmisión experimental de la enfermedad puede ocurrir en ausencia del parásito ([Baxa-Antonio y col., 1992](#); [Eaton y Kent, 1992](#)).

La signología presente en la L. Plasmocitoídea es bastante inespecífica, observándose peces letárgicos con el dorso oscuro. Además, los peces afectados nadan cerca de la superficie y presentan marcada palidez branquial, lo cual es presuntivo de anemia. Un alto porcentaje cursa con exoftalmia bilateral debido a la marcada acumulación de tejido neoplásico en la zona retro-orbital ([Kent y col., 1990](#)).

Al realizar la necropsia, internamente se ha observado un marcado aumento de tamaño del riñón y bazo, evidenciando aspecto moteado y color grisáceo. Además, se ha visualizado la presencia de petequias en hígado, grasa mesentérica, páncreas, corazón, músculo esquelético, piel y ojos. Los intestinos presentan engrosamiento de la pared y en algunos peces se ha diagnosticado ascitis serosa o serosanguinolenta ([Kent y col., 1990](#)).

Observaciones de campo reportan que la enfermedad se transmite horizontalmente por cohabitación en agua dulce. Sin embargo, a la fecha, no se ha logrado demostrar su transmisión en agua salada. Respecto a la transmisión vertical se cree que la enfermedad se transmite de padres infectados a la progenie vía huevo o esperma, o bien, que el agente estaría estrechamente asociado a la ova ([Kent y col., 1993](#)).

En relación con la presentación de L. Linfoblástica en agua de mar, [Kent y col. \(1993\)](#) postulan que en la fase de smolts la enfermedad estaría en forma subclínica antes de ser introducidos a las jaulas y que se desarrollaría entre los seis meses y el año posterior al ingreso en agua de mar. Los porcentajes de mortalidad detectados en esta etapa han sido muy variables, llegando incluso al 50% de pérdida del stock de la producción total.

Respecto a la susceptibilidad interespecies se ha demostrado que salmón chinook (*O. tshawytscha*) y salmón del atlántico (*S. salar*) son susceptibles a L. Plasmocitoídea mediante inyección de tejido infectado. Por el contrario, salmón coho (*O. kisutch*) y trucha arco iris (*O. mykiss*) parecen ser resistentes ([Newbound y Kent, 1991b](#)).

Dado que esta entidad ha sido reportada recientemente en el país, la información existente en la actualidad es

limitada. Al respecto, se ha hecho necesario caracterizar esta enfermedad determinando los tipos de lesiones macro y microscópicas, localización y grado de severidad, comparando las lesiones entre las distintas especies salmonídeas, además de relacionar la presentación de los cuadros patológicos con la detección del microsporidio *N. salmonis*. La ocurrencia de esta nueva enfermedad en el país enfatiza la necesidad de realizar estudios tendientes a establecer las fuentes de infección, etiología y patogenia de esta condición, como así mismo, el de mejorar las técnicas diagnósticas para la misma.

MATERIAL Y METODOS

Peces. El material de la presente investigación estuvo constituido por 315 peces clínicamente sospechosos de L. Linfoblástica. De éstos, 113 correspondieron a salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*), 89 a truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), 100 salmones del atlántico (*Salmo salar*) y 13 salmones chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), de los cuales se obtuvieron muestras de sangre para análisis de laboratorio y riñón, hígado, bazo, páncreas, ciegos pilóricos, músculo y corazón para análisis histológico.

Los peces examinados provenían de 24 centros de cultivo en fase de agua de mar localizados en la X Región, los cuales se obtuvieron entre los meses de febrero y diciembre de 1996. La obtención de los peces se realizó utilizando un sistema de muestreo no aleatorio (dirigido), seleccionando peces que clínicamente evidenciaban L. Linfoblástica.

Las muestras para análisis histopatológico se obtuvieron de peces que al análisis de laboratorio (hematológico y celular) indicaban previamente posible L. Linfoblástica, en virtud de la presencia de esporas intranucleares, células linfoblásticas en órganos y sangre, además, la presencia de anemia y/o signos clínicos internos y externos de relevancia diagnóstica para la enfermedad, basados en los antecedentes reportados por [Núñez \(1997\)](#).

Las lesiones presentes se protocolizaron y clasificaron de acuerdo al tipo de afección observada: trastornos degenerativos, circulatorios, necróticos, etc.

Estudio clínico y macroscópico. El examen clínico consistió en la observación visual de los peces en las balsas jaulas, consignándose aspectos tales como coloración del pez, ubicación (orillado), palidez branquial y exoftalmia.

La captura de los peces se realizó utilizando quecha, posteriormente se procedió al sacrificio mediante asfixia, evaluándose las lesiones macroscópicas externas presentes en piel, branquias, ojos, etc. Con posterioridad, los peces fueron necropsiados según el método descrito por [Navarro \(1991\)](#) a fin de determinar la presencia de lesiones en los órganos internos.

Estudio histopatológico. Para el estudio histopatológico las muestras de riñón, hígado, bazo, páncreas, ciegos pilóricos, músculo y corazón se fijaron en formalina bufferizada al 10%, con posterioridad éstas se laminaron y procesaron en autotécnico a fin de ser deshidratadas e impregnadas en parafina. Finalmente, se incluyeron en parafina sólida para ser cortadas entre 5-6 micras y teñidas con Hematoxilina Eosina ([Luna, 1968](#)).

Estudio en laboratorio clínico. El análisis hematológico, consideró la realización de frotis sanguíneos (tinción Wright Giemsa) y determinación de hematocrito, a fin de evaluar la presencia de esporas intranucleares, células linfoblásticas y posibles cuadros de anemia. Además, se realizaron improntas de órganos (hígado, riñón y bazo) a fin de determinar la presencia de células neoplásicas en los distintos órganos, para lo cual se recurrió a la utilización de la tinción Wright Giemsa.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan en relación con los tipos de estudio realizados:

- A. Características clínicas y aspectos lesionales macroscópicos en salmonídeos afectados de L. Linfoblástica.
 B. Aspectos lesionales microscópicos de órganos afectados con L. Linfoblástica. C. Características histológicas de las células linfoblásticas en riñones de salmonídeos con L. Linfoblástica.

En el cuadro 1, se presentan el número y porcentaje de salmonídeos utilizados en la presente investigación que al examen clínico evidenciaban signología concordante con L. Linfoblástica. De igual forma, se presenta el número y porcentaje de exámenes hematológico/celular positivos a L. Linfoblástica de peces clínicamente sospechosos a esta condición. Finalmente, se presenta el número y porcentaje de peces que al examen histopatológico evidenciaron L. Linfoblástica, a partir de aquellos que dieron positividad al examen hematológico/celular.

A continuación, se presentan las características histológicas correspondientes al análisis efectuado en riñón, hígado, bazo, páncreas y ciegos pilóricos de Salmonídeos (*O. mykiss*, *S. salar*) afectados con L. Linfoblástica.

Riñón (5): La totalidad de los riñones presentaron infiltrado linfoblástico en todas las especies de salmonídeos (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*) estudiadas. Las células linfoblásticas a nivel renal evidenciaron diferencias en sus características histológicas en cuanto a su forma (pleomorfismo), componentes citoplasmáticos y nucleares. Por otra parte, el infiltrado linfoblástico originó destrucción tubular y glomerular.

Hígado (1): En la trucha arcoiris (*O. mykiss*) se apreció que el parénquima hepático presentó escasas células linfoblásticas. En la periferia de algunas arteriolas y a nivel del espacio periportal se observaron idénticas células tumorales. Por otra parte, el hígado mostró atrofia moderada, células picnóticas y trastornos degenerativos grasos macro y microvacuolares.

CUADRO 1. Número y porcentaje de salmonídeos según especie, en relación al tipo de estudio realizado.

Number and percentage of salmonids according to species, and kind of study carried out.

Tipo de Estudio	TIPOS DE SALMONIDEOS								TOTAL		
	<i>O. mykiss</i>		<i>O. kisutch</i>		<i>S. salar</i>		<i>O. tshawytscha</i>				
	Nº	%		Nº	%		Nº	%		Nº	%
Clinico	89	100,0	113	100,0		100	100,0		13	100,0	315 100,0
Hematológico/ Celular	15	16,8	14	12,3		28	28,0		0	0,0	57 18,0
Histológico	5	5,6	7	6,1		6	6,0		0	0,0	18 5,7

A. ESTUDIO CLINICO Y DE ASPECTOS LESIONALES MACROSCOPICOS EN SALMONIDEOS AFECTADOS DE L. LINFOBLASTICA.

A. ESTUDIO CLINICO Y DE ASPECTOS LESIONALES MACROSCOPICOS EN SALMONIDEOS AFECTADOS DE L. LINFOBLASTICA.

CUADRO 2. Características clínicas y lesiones macroscópicas en salmonídeos (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*), afectados de leucemia linfoblástica.

Clinical characteristics and macroscopic lesions in salmonids (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*), with lymphoblastic leukemia.

Características clínicas y leiones macroscópicas	TIPOS DE SALMONIDEOS						TOTAL N=18	
	<i>O. mykiss</i> N=5		<i>O. kisutch</i> N=7		<i>S. salar</i> N=6			
	n	%	n	%	N	%		
Piel oscura	5	100,0	7	100,0	6	100,0	18 100,0	
Pez orillado	5	100,0	7	100,0	6	100,0	18 100,0	
Palidez branquial	4	80,0	5	71,4	5	83,3	14 77,7	
Exoftalmia bilateral	2	40,0	2	28,5	3	50,0	7 38,8	
Hemorragia en base de aletas	1	20,0	1	14,2	2	33,3	4 22,2	
Abdomen abultado	2	40,0	1	14,2	2	33,3	5 27,7	

CUADRO 3. Alteraciones macroscópicas internas en salmonídeos (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*), afectados de leucemia linfoblástica.

Alteraciones Macroscópicas en órganos internos	TIPOS DE SALMONIDEOS						TOTAL N=18	
	<i>O. mykiss</i> N=5		<i>O. kisutch</i> N=7		<i>S. salar</i> N=6			
	n	%	n	%	N	%		
Renomegalia	3	60,0	6	85,7	5	83,3	14 77,7	
Palidez hepática	4	80,0	4	57,1	4	66,6	12 66,6	
Estómago con líquido	2	40,0	2	28,5	1	16,6	5 27,7	
Reno y esplenomegalia	2	40,0	1	14,2	1	16,6	4 22,2	
Enteritis	1	20,0	0	0,0	2	33,3	3 16,6	
Coloración anormal en músculo y ciegos pilóricos	0	0,0	0	0,0	2	33,3	2 11,1	

B. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE ÓRGANOS CON L. LINFOBLÁSTICA.**CUADRO 4. Estudio histopatológico de órganos con leucemia linfoblástica en salmonídeos (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*).**

Histopathologic study of organs with lymphoblastic leukemia in salmonids (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*).

Organos con L. linfoblástica	TIPOS DE SALMONÍDEOS											
	<i>O. mykiss</i>			<i>O. kisutch</i>			<i>S. salar</i>			TOTAL		
	N	n	%	N	n	%	N	n	%	N	n	%
Riñón	5	5	100,0	7	7	100,0	4	4	100,0	16	16	100,0
Hígado	4	1	25,0	7	0	0,0	3	0	0,0	14	1	7,1
Bazo	2	1	50,0	0	0	0,0	1	0	0,0	3	1	33,3
Páncreas	0	0	0,0	0	0	0,0	1	1	100,0	1	1	100,0
C. Pilóricos	0	0	0,0	0	0	0,0	1	1	100,0	1	1	100,0
Músculo	0	0	0,0	0	0	0,0	1	0	0,0	1	0	0,0
Corazón	1	0	0,0	1	0	0,0	0	0	0,0	2	0	0,0
TOTAL	12	7	58,3	15	7	46,6	11	6	54,5	38	20	52,6

N: Número de muestras analizadas.

n: Número de muestras afectadas.

C. CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS DE LAS CELULAS LINFOBLASTICAS EN RIÑONES DE SALMONIDEOS CON L. LINFOBLASTICA.

CUADRO 5. Características histológicas de las células linfoblásticas en riñones de salmonídeos (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*), con leucemia linfoblástica.Histological characteristics of lymphoblastic in salmonids kidneys (*O. mykiss*, *O. kisutch*, *S. salar*), with lymphoblastic leukemia.

	CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS DE LAS CELULAS LINFOBLASTICAS						
	Citoplasma		Núcleo		Pleomorfismo	↑tamaño	C.I.I
	Pleomorfismo	Cantidad	Densidad	Pleomorfismo			
<i>O. mykiss</i> (5)	3	2	3	3	3	3	No
	2	1	2	1	1	1	No
	3	1	2	3	3	3	No
	2	1	2	2	2	2	No
	2	1	2	2	2	2	No
<i>O. kisutch</i> (7)	1	1	2	1	1	1	No
	1	0	0	1	1	1	Sí
	1	0	0	0	1	1	No
	1	1	0	1	1	1	No
	1	1	1	1	1	1	No
	1	1	1	2	1	1	No
	1	1	1	1	1	1	No
<i>S. salar</i> (4)	1	1	2	1	1	1	Sí
	1	1	1	1	1	1	No
	2	1	1	1	1	1	No
	1	1	1	1	1	1	No

0= Normal, 1= Leve Incremento, 2= Moderado Incremento, 3= Severo Incremento,

C.I.I.= Cuerpos de Inclusión Intranucleares.

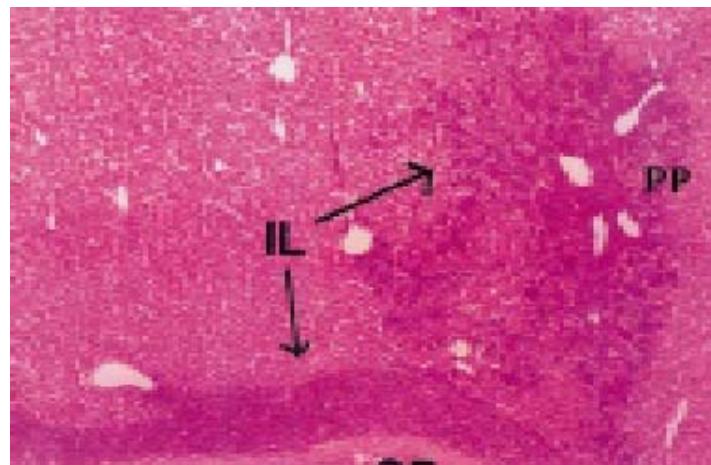


Figura 1. Hígado de Salmón del Atlántico (*S. salar*). Severo infiltrado linfoblástico (IL) difuso a nivel periportal (PP). H/E 40x.

Liver of Atlantic Salmon (*S. salar*). Severe diffuse lymphoblastic infiltrated (IL) in periportal space (PP). H/E 40x.

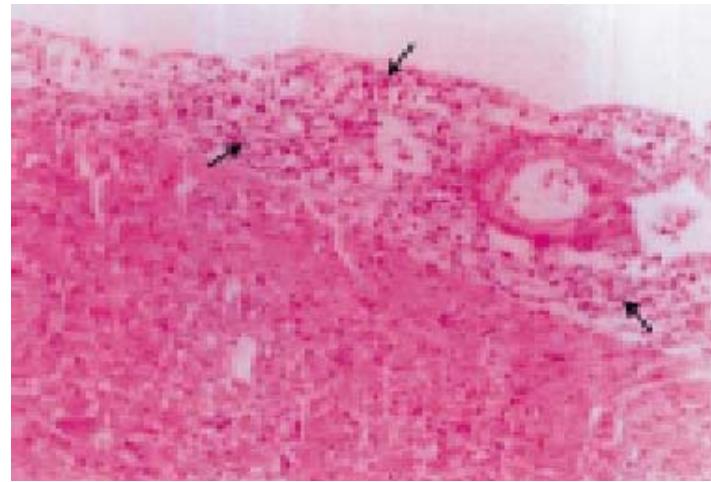


Figura 2. Corazón de Trucha arcoiris (*O. mykiss*). Obsérvese la presencia de células linfoblásticas () a nivel del pericardio. H/E 80x.

Heart of Rainbow Trout (*O. mykiss*). Lymphoblastic cells in pericardium (). H/E 80x.

Bazo (1): El bazo (*O. mykiss*) presentó leve infiltrado linfoblástico difuso. Dichas células evidenciaron evidentes características similares que las observadas en riñón (pleomorfismo celular y nuclear, citoplasma denso y nucléolos prominentes).

Las muestras afectadas por infiltrado linfoblástico en el salmón del atlántico (*S. salar*) correspondieron a páncreas (1) y ciegos pilóricos (1). En páncreas, se observó pérdida de la estructura endocrina (Islotes de Langerhans), disminución del tejido adiposo circundante, hemorragias difusas y hemosiderina. El infiltrado celular evidenció acúmulos linfoides en la totalidad del órgano, no detectándose células neoplásicas en los vasos sanguíneos.

En los ciegos pilóricos, el infiltrado linfoblástico se observó a nivel de la serosa, submucosa y corion de la mucosa.

DISCUSION

En los últimos años, junto a los excelentes resultados obtenidos en el cultivo de salmones y truchas se han presentado nuevas enfermedades anteriormente desconocidas en el medio nacional, destacando entre ellas la presencia de patologías de origen bacteriano y viral de alta virulencia e infectividad ([Hidalgo, 1995](#)).

El hallazgo de una nueva condición de carácter neoplásico conocida como L. Linfoblástica, de etiología aún no claramente definida, ha ocasionado importantes pérdidas en la salmonicultura nacional, desestabilizando el desarrollo de esta actividad. De tal modo, que frente a esta problemática, se ha llevado a cabo la presente investigación a fin de contribuir al conocimiento de esta afección a nivel nacional.

Según los resultados obtenidos en el estudio realizado, un 5,7% de los peces muestrados dieron positividad al análisis histológico de L. Linfoblástica. Sin embargo, cabe señalar que del punto de vista clínico, el 100% de los peces analizados eran sospechosos y que el 18,0% había dado positividad al análisis hematológico/celular. A este respecto, el salmón del atlántico (*S. salar*) presentó un grado de certeza diagnóstica de un 21,4% para el análisis histológico versus el estudio hematológico/celular. Una mayor certeza se observó en el caso de la trucha arco iris (*O. mykiss*) y salmón coho (*O. kisutch*), con un 33,3% y 50% respectivamente.

De los resultados observados se desprende que el examen clínico en términos generales, tiene un grado de certeza de sólo un 5,7%, lo cual lleva necesariamente a la necesidad de recurrir a análisis más específicos como el diagnóstico histológico, el cual da una certeza diagnóstica del 100%. A este respecto, [Newbound y Kent \(1991b\)](#), afirman que el diagnóstico de L. Linfoblástica debe basarse en el examen histológico de los órganos afectados. De igual forma, [Schlotfeldt y Alderman \(1995\)](#), señalan la necesidad de recurrir al análisis microscópico, ya sea a través de cortes o frotis de tejido renal o sangre para determinar L. Linfoblástica. Sin embargo, a este respecto se debe tener presente que incluso dentro de esta técnica, la experiencia del patólogo es fundamental. Estudios realizados por [Stephen y col. \(1995\)](#), en que compara diagnósticos de patólogos con diversos grados de entrenamiento en el reconocimiento de la L. Linfoblástica en Salmonídeos, señalan diferencias de hasta un 35%. Esto debe ser un aspecto importante a considerar cuando se recurre a centros diagnósticos que ofrecen servicios en el área de la Ictiopatología.

El 5,7% de certeza diagnóstica en cuadros de L. Linfoblástica detectada en la totalidad de los Salmonídeos estudiados, es levemente superior al 4,7% reportado por [Enríquez y col. \(1997\)](#) en los mismos tipos de peces. A este respecto, cabe señalar que la investigación efectuada por dicho autor, comprendió la X y XI Regiones, en cambio los peces analizados en el presente estudio, en su totalidad correspondían a la X Región. Las diferencias observadas entre ambos trabajos obedecen a que en la XI Región no se detectaron peces positivos a L. Linfoblástica, lo cual llevó a que dentro del total de muestras analizadas en ambas regiones, los casos positivos dieran un porcentaje inferior al logrado en el presente estudio.

Si bien los valores obtenidos de L. Linfoblástica en Salmonídeos representan un problema de importancia a nivel nacional, estos son considerablemente menores al 15% reportado por [Morrison y col. \(1990\)](#) en salmones chinook (*O. tshawytscha*) cultivados en Washington, USA, y al 13% determinado por [Kent y col. \(1993\)](#) en British Columbia, Canadá, en la misma especie.

Los signos clínicos y alteraciones externas observadas en peces positivos a L. Linfoblástica en el presente estudio, muestran que la totalidad de los Salmonídeos presentaron piel oscura y comportamiento letárgico y orillado. Estas características se aprecian en diferentes cuadros patológicos en peces e incluso se han detectado en aquellos que son sometidos a severas condiciones de estrés ambiental ([Wrege*,1997](#)). De tal modo, que no existen características clínicas típicas que puedan atribuirse específicamente a cuadros de L. Linfoblástica.

Una característica clínica de los peces con L. Linfoblástica que se evidenció sobre el 71,4% de los casos fue la palidez branquial, la cual corresponde a la expresión externa del estado anémico detectado en los peces mediante valoración del hematocrito. Esta afección fue la alteración externa más importante observada en salmones chinook afectados de L. Plasmocitoídea por [Hedrick y col. \(1990\)](#). Sin embargo, [Flores, en 1996](#) determinó que a pesar de ser la palidez branquial un signo importante en la determinación de anemia, no es un método certero, ya que no siempre los peces con palidez branquial presentan valores bajos de hematocrito. Al mismo tiempo, peces que no presentan palidez branquial, dan hematocritos disminuidos.

Otro signo externo que se observó en la inspección de peces con L. Linfoblástica fue la exoftalmia bilateral, detectada principalmente en el salmón del atlántico (*S. salar*) (50%) y trucha arco iris (*O. mykiss*) (40%), sin la presencia de hemorragias intra o perioculares. Según [Egidius \(1984\)](#), se ha observado exoftalmia en salmones expuestos a agentes de la Septicemia Viral Hemorrágica y la Necrosis Hematopoyética Infecciosa, así como a la enterobacteria *Yersinia ruckeri*. Además, dicho autor describe que el *Renibacterium salmoninarum* produce exoftalmia en salmones del atlántico. Por otra parte, [Kent y col. \(1990\)](#) detectaron un 20% de severa exoftalmia bilateral en peces con L. Plasmocitoídea debido al infiltrado neoplásico presente en la órbita ocular. En tanto [Núñez \(1997\)](#), determinó un 28,6% de presentación en peces con L. Linfoblástica cultivados en el país.

La presencia de hemorragia en la base de las aletas observada particularmente en el salmón del atlántico (*S. salar*) (33,3%), constituye una característica diferencial importante de la enfermedad que debe diferenciarse de cuadros septicémicos de origen viral o bacteriano ([Schlotfeldt y Alderman, 1995](#)). Por otra parte, cabe señalar que [Kent y Dawe \(1993\)](#) mediante examen histológico determinaron L. Plasmocitoídea por infiltración de plasmoblastos en riñón, bazo, hígado y estómago en peces clínicamente normales.

Un aspecto importante de destacar lo constituye el hecho de que el salmón del atlántico (*S. salar*) presentó en mayor porcentaje los signos clínicos y lesiones macroscópicas externas observadas en los peces con L. Linfoblástica, seguido de la trucha arco iris (*O. mykiss*) y el salmón coho (*O. kisutch*) respectivamente. Los signos observados, como piel oscura, pez orillado, palidez branquial y exoftalmia bilateral, corresponden a los descritos por [Bravo \(1995\)](#), [Enríquez y col. \(1997\)](#) y [Núñez \(1997\)](#) para las especies salmonídeas con diagnóstico de L. Linfoblástica cultivadas en el país. Además, concuerda con la signología descrita en Canadá y Estados Unidos para salmón chinook afectado de L. Plasmocitoídea descrita por [Kent y col. \(1990\)](#), [Hendrick y col. \(1990\)](#) y [Newbound y Kent \(1991b\)](#).

En relación con las alteraciones macroscópicas observadas en los órganos internos de Salmonídeos afectados de L. Linfoblástica, se encontró renomegalia en el 77,7% de los casos, estando asociada con esplenomegalia en el 22,2% de los ejemplares de truchas (*O. mykiss*). Palidez hepática estuvo presente en el 66,6% del total de los casos, lo que según [Núñez \(1997\)](#) podría deberse a la anemia con que cursan los peces afectados de L. Linfoblástica. Los hallazgos observados en el presente estudio, concuerdan con lo descrito por [Kent y col. \(1990\)](#), [Newbound y Kent \(1991b\)](#) y [Kent \(1992\)](#) en relación a alteraciones macroscópicas internas observadas en salmones chinook (*O. tshawytscha*) con L. Plasmocitoídea. En el salmón del atlántico (*S. salar*) se observó coloración anormal en los ciegos pilóricos y tejido muscular en asociación con hemorragias en la base de las aletas, lo que podría indicar que existe algún tipo de asociación entre ambas alteraciones.

La especie que presentó un mayor porcentaje de afección patológica interna fue la trucha arco iris (*O. mykiss*) seguida del salmón del atlántico (*S. salar*) y el salmón coho (*O. kisutch*).

Histológicamente, en la totalidad de los riñones analizados se observó infiltración linfoblástica en las tres especies de Salmonídeos en estudio, lo cual es concordante con las alteraciones macroscópicas internas detectadas en los peces con L. Linfoblástica (renomegalia), lo cual indica que este órgano es el blanco del proceso infiltrativo neoplásico y el que primeramente se ve afectado, siendo de fácil detección macroscópica a la necropsia.

La presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en linfoblastos en las muestras renales en salmón coho (*O. kisutch*) y salmón del atlántico (*S. salar*) corresponden a la etapa de espora del parásito *Nucleospora salmonis* de acuerdo a las características mencionadas por [Hedrick y col. \(1990\)](#), [Kent y col. \(1991\)](#) y [Chilmonczyk y col. \(1991\)](#).

De las muestras de órganos de peces afectados con L. Linfoblástica, sólo un hígado resultó con infiltrado linfoblástico, correspondiendo éste a trucha arco iris (*O. mykiss*). Sin embargo, la mayoría de los hígados de los Salmonídeos analizados presentaron palidez no evidenciando otros tipos de alteraciones. En relación con la coloración grisácea observada macroscópicamente en forma de puntillado, la cual en algunas ocasiones se encuentra asociada con cuadros de hepatomegalia, se observó que este cambio de color se aprecia en etapas avanzadas del proceso neoplásico, posterior a la infiltración linfoblástica ([Entrala*, 1997](#)).

El estudio microscópico del hígado evidenció infiltración linfoblástica y presencia de linfocitos en los sinusoides y espacios periportales, apreciándose una densidad celular media a alta. Estos hallazgos son concordantes con los estudios histológicos realizados por [Hedrick y col. \(1990\)](#) y [Kent \(1992\)](#) en hígados de salmones chinook afectados de L. Plasmocitoídea.

Al realizar un estudio de la presentación de L. Plasmocitoídea en Canadá, [Kent y col. \(1993\)](#) observaron que la proliferación de plasmoblastos en órganos no hematopoyéticos se observa en pocos peces y la expresión clínica en ellos es por lo tanto muy baja. Por otra parte, [Kent \(1992\)](#) ha expresado que el riñón y el bazo son los órganos primariamente afectados. A este respecto, en el presente estudio se observó que el 33,3% de los bazos analizados histológicamente en los peces estaba afectado de L. Linfoblástica. Además, cabe mencionar el hecho que sólo uno de los tres bazos analizados en las muestras de los peces resultó afectada microscópicamente, por lo que la esplenomegalia no siempre se relaciona con infiltrado tumoral en casos de cuadros con L. Linfoblástica.

El bazo, del punto de vista histológico, fue el órgano más difícil de observar debido a que su estructura celular está formada por células linfocíticas y linfoblásticas normales, las cuales cumplen funciones tanto hematopoyéticas como hemocateréticas, de tal modo que se requiere un alto grado de entrenamiento en la diferenciación de los tipos celulares. La presentación del infiltrado neoplásico difuso, congestión e hiperplasia de las células reticulares observadas en todas las especies estudiadas concuerda con lo descrito por [Kent y col. \(1990\)](#).

La detección de esporas de *N. salmonis* en núcleos de linfoblastos en el tejido esplénico del salmón del atlántico (*S. salar*) evidencia un mayor grado de susceptibilidad de esta especie al parásito. La observación de *N. salmonis* como un cuerpo esférico eosinofílico en el centro del núcleo rodeado por cromatina nuclear, corresponde con lo observado por [Elston y col. \(1987\)](#), [Morrison y col. \(1990\)](#), [Hedrick y col. \(1991\)](#), [Kent \(1992\)](#) y [Wongtavatchai y col. \(1995\)](#) en secciones de tejido renal, hepático y esplénico entre otros, teñidos con Hematoxilina - Eosina y por [Hedrick y col. \(1990\)](#) con muestras de los mismos tejidos fijados en solución Davidson.

En el presente estudio, riñón, bazo e hígado fueron los únicos órganos afectados con L. Linfoblástica en trucha arco iris (*O. mykiss*) y salmón coho (*O. kisutch*). Por otra parte, en el salmón del atlántico (*S. salar*) se observó infiltrado linfoblástico en una gran variedad de órganos, resaltando páncreas y ciegos pilóricos, lo que nos indica que las alteraciones producidas en estos tejidos son fácilmente detectables macroscópicamente mediante el examen interno de los peces. La presentación del cuadro neoplásico en estos órganos se explica por la mayor cronicidad del mismo. [Kent y col. \(1990\)](#) y [Hedrick y col. \(1990\)](#), describen en salmones chinook (*O. tshawytscha*) con L. Plasmocitoídea infiltración de plasmoblastos en la mayoría de los órganos mencionados anteriormente para el caso del salmón del atlántico (*S. salar*).

En forma decreciente, los órganos más importantes que presentaron infiltrado linfoblástico fueron riñón

(100%), bazo (33,3%) e hígado (7,1%) en todas las especies estudiadas. A este respecto, se ha logrado demostrar mediante estudios experimentales de transmisión realizados por Hedrick y col. (1991) que los principales órganos afectados corresponden a riñón, bazo, hígado y páncreas, a las tres semanas post - inoculación en salmones chinook (*O. tshawytscha*). De igual forma, Kent (1992) describe a riñón, bazo y ojo como los órganos primariamente afectados en salmón chinook (*O. tshawytscha*) con L. Plasmocitoídea.

Kent (1992), Kent y Dawe (1993) y Stephen y Ribble (1995) mencionan que el diagnóstico de L. Plasmocitoídea por histopatología debería basarse en la proliferación de linfocitos inmaduros en el riñón posterior y en al menos un órgano no hematopoyético, en tejidos preparados rutinariamente con Hematoxilina - Eosina. Por otra parte, la diferencia entre neoplasia (especialmente hémicos), e hiperplasia o inflamación puede a veces ser sutil, ya que, la presencia de reacción inflamatoria, bajos niveles de mitosis o necrosis y presencia de bacterias complican esta diferenciación. Antecedentes anamnésicos, microbiológicos, signos clínicos y aspectos lesionales de casos afectados con L. Linfoblástica permiten determinar la presencia y el estado de esta condición (Newbound y col., 1993; Stephen y col., 1995; Kent y col., 1995; Kent y col., 1996).

Finalmente, cabe mencionar que el presente estudio revela importantes aspectos de la L. Linfoblástica en relación al cuadro clínico e histopatológico.

RESUMEN

Con el propósito de determinar los tipos de lesiones macro y microscópicos presentes en Salmonídeos afectados de L. Linfoblástica en la X Región (Latitud 41°20' S - 43° 35' S), de igual forma su localización y grado de severidad entre las distintas especies y relacionarlas con la presencia del microsporideo *Nucleospora salmonis*, se analizaron 113 *O. kisutch*, 100 *S. salar*, 89 *O. mykiss* y 13 *O. tshawytscha*. Además, se estudiaron muestras de riñón, bazo, hígado, páncreas y ciegos pilóricos histológicamente positivas a L. Linfoblástica.

Histológicamente se determinó un 5,7% de casos positivos en peces clínicamente afectados de L. Linfoblástica, caracterizándose por presentar piel oscura, ubicación orillada y palidez branquial. En el salmón del atlántico (*S. salar*) destacó, además la exoftalmia bilateral y la presencia de hemorragias en la base de las aletas. Internamente, los peces presentaron renomegalia y palidez hepática. La trucha arco iris (*O. mykiss*) presentó un 40% de esplenomegalia y el salmón del atlántico (*S. salar*) un 33,3% de coloración anormal en músculo y ciegos pilóricos.

Los órganos más afectados con L. Linfoblástica en todas las especies estudiadas fueron riñón, bazo e hígado, siendo la principal asociación de órganos afectados la existente entre riñón y bazo.

Microscópicamente, todos los riñones presentaron infiltrado linfoblástico, diagnosticándose 62,5% de positividad en las muestras analizadas. La trucha arco iris (*O. mykiss*) presentó severas alteraciones necróticas tubulares y en el salmón del atlántico (*S. salar*) se observó marcada reacción inflamatoria. Hígado, bazo, páncreas y ciegos pilóricos también se vieron afectados por infiltrado linfoblástico, el cual evidenció pleomorfismo celular y nuclear. Por otra parte, se detectó *Nucleospora salmonis* en tejido renal y esplénico en el salmón coho (*O. kisutch*) y el salmón del atlántico (*S. salar*) en linfoblastos.

* Comunicación personal. Dr. Bernd Wrege. Patagonia Salmon Farming S.A., Puerto Montt.

* Comunicación personal. Dr. Patricio Entrala. Fundación Chile (Ictiopatología), Puerto Montt.

BIBLIOGRAFIA

Enterocytozoon salmonis to chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *J. Protozool.* 39: 699-702.

BRAVO, S. 1995. Reporte de *Enterocytozoon salmonis* en Chile. *Chile Pesquero*. 87: 23-25.

CHILMONCZYK, S., W. COX, R. HEDRICK. 1991. *Enterocytozoon salmonis* N.Sp.: An Intranuclear Microsporidium from Salmonid Fish. *J. Protozool.* 30: 264-269.

DOCKER, M., M. KENT, D. HERVIO, J. KHATTR, L. WEISS, A. CALI, R. DEVLIN. 1997. Ribosomal DNA Sequence of Nucleospora salmonis Hedrick, Groff and Baxa, 1991 (Microsporea: Enterocytozoonidae): Implications for Phylogeny and Nomenclature. *J. Eukariot. Microbiol.* 44: 55-60.

EATON, W., M. KENT. 1992. A retrovirus in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) with Plasmacytoid Leukemia and evidence for the etiology of the disease. *Cancer Res.* 52: 6496-6500.

EATON, W., B. FOLKINS, M. KENT. 1994. Biochemical and histologic evidence of Plasmacytoid Leukemia and Salmon Leukemia Virus (SLV) in wild-caught chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* from British Columbia expressing Plasmacytoid Leukemia. *Dis. Aquat. Organ.* 19: 147-151.

EGIDIUS, E. 1984. Diseases of salmonids in aquaculture. *Helgolander Meersunters.* 37: 547-569.

ELSTON, R., M. KENT, L. HARRELL. 1987. An Intranuclear Microsporidium associated with acute anemia in chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *J. Protozool.* 34: 274-277.

ENRIQUEZ, R., J.P. NUÑEZ, M. SOTO, D. SUÁREZ, M. MONRÁS, E. PAREDES, V. CUBILLOS. 1997. Lymphoblastic leukemia and its relations with another diseases of salmon in Southern Chile. EAFP. Eight International Conference on Diseases in Fish and Shellfish. Edinburg, Scotland.

ENRIQUEZ, R., M. MONRÁS, J.P. NUÑEZ, M. SOTO, D. SUÁREZ, V. CUBILLOS. 1998. Leukaemia in salmon culture in Chile. Third International Symposium Aquatic Animal Health, Baltimore, Maryland. USA.

FLORES, A.M. 1996. Estudio de las patologías virales intraeritrocitarias en Salmonídeos de cultivo intensivo en el sur de Chile. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

HEDRICK, R., J. GROFF, T. McDOWELL, M. WILLIS, W. COX. 1990. Hematopoietic intranuclear microsporidian infections with features of leukemia in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Organ.* 8: 189-197

HEDRICK, R., J. GROFF, D. BAXA. 1991. Experimental infections with *Enterocytozoon salmonis*: an intranuclear microsporidium from chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Organ.* 10: 103-108.

HIDALGO, L. 1995. Programa de producción de ovas de Salmonídeos con baja prevalencia de enfermedades específicas. En: Seminario-taller: Riesgos del potencial ingreso y propagación de patógenos salmonídos en Chile. APTS-INTESEL, Puerto Montt, Chile.

KENT, M., S.DAWE. 1990. Experimental transmission of a Plasmacytoid Leukemia of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Cancer Res.* 50: 5679-5681.

KENT, M., J. GROFF, G. TRAXLER, J. ZINKL, J. BAGSHAW. 1990. Plasmacytoid Leukemia in seawater reared chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Organ.* 8: 199-209.

KENT, M., J. BAGSHAW, G. NEWBOUND, G. TRAXLER, S. DAWE, J. ROOME, W. EATON, J. GROFF,

- D. SPEARE. 1991. Plasmacytoid Leukemia (Marine Anemia): Viral or Microsporidian Etiology?. *Newsletter, FHS-American Fisheries Society* 19: 1-2.
- KENT, M. 1992. Diseases of Seawater netpen-reared Salmonid fishes in the Pacific Northwest. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*: 59-62.
- KENT, M., C. NEWBOUND, C. DAWE, C. STEPHEN, W. EATON, D. TRAXLER, D. KIESER, R. MARKHAM. 1993. Observations on the transmission and range of Plasmacytoid Leukemia of chinook salmon. *Newsletter, FHS-American Fisheries Society* 21: 1-3.
- KENT, M., S. DAWE. 1993. Further evidence for a viral etiology in Plasmacytoid Leukemia of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Organ.* 15: 115-121.
- KENT, M., V. RANTIS, J. BAGSHAW, S. DAWE. 1995. Enhanced detection of *E. salmonis* (Microspora), an intranuclear microsporean of salmonid fishes, with the Warthin - Starry stain combined with haematoxilin and eosin. *Dis. Aquat. Organ.* 23: 235-237.
- KENT, M., D. HERVIO, M. DOCKER, R. DEVLIN. 1996. Taxonomy Studies and Diagnostic Tests for Myxosporean and Microsporidian Pathogens of Salmonid Fishes Utilising Ribosomal DNA sequence. *J.Eukariot.Microbiol.* 43: 98 - 99.
- LUNA, L. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition, McGraw-Hill Book Company. New York. USA.
- MENDEZ, R. 1996. En la temporada 1995: Cultivos sobrepasan los US \$500 millones. *Aquanoticias Internacional* 28: 7-17.
- MENDEZ, R. 1997. La acuicultura a tres lustros de su partida. *Aquanoticias Internacional*. 35: 21-33.
- MORRISON, J., E. MACCONNELL, P. CHAPMAN, R. WESTGARD. 1990. Microsporidium- induced lymphoblastosis in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* in freshwater. *Dis. Aquat. Organ.* 8: 99-104.
- NAVARRO, J. 1991. Flora bacteriana de hígado y riñón de Salmonídeos del sur de Chile. Estandarización de un método de identificación y estandarización de sensibilidad antimicrobiana. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- NEWBOUND, G., M. KENT. 1991a. Prevalence of Plasmacytoid Leukemia in British Columbia chinook salmon. *Newsletter, FHS-American Fisheries Society* 29: 1-2.
- NEWBOUND, G., M. KENT. 1991b. Experimental interspecies transmission of Plasmacytoid Leukemia in salmonid fishes. *Dis. Aquat. Organ.* 10: 159-166.
- NEWBOUND, G., R. MARKHAM, D. SPEARE, S. SAKSIDA, B. DESPRES, B. HORNEY, F. KIBENGE, J. SHEPPARD, G. WRIGHT, M. KENT. 1993. Production of monoclonal antibodies specific for antigens derived from tissue of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) affected with Plasmacytoid Leukemia. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1426-1431.
- NUÑEZ, J.P. 1997. Estudio de la Leucemia Linfoblástica y su asociación con otras enfermedades en Salmonídeos de cultivo intensivo en fase marina del sur de Chile. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- SCHLOTFELDT, H., D. ALDERMAN. 1995. What should I do? A practical guide for the fresh water fish farmer. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 15: Supplement.

STEPHEN, C., C. RIBBLE. 1995. The effects of changing demographics on the distribution of marine anemia in farmed salmon in British Columbia. *Can. Vet. J.* 36: 557-562.

STEPHEN, C., C. RIBBLE, M. KENT. 1995. Observer Variation in the Histological Diagnosis of Plasmacytoid Leukemia (Marine Anemia). *Can. J. Vet. Res.*, 59: 15 - 19.

WONGTAVATCHAI, J., P. CONRAD, R. HEDRICK. 1995. *In vitro* Characteristics of the Microsporidian: *Enterocytozoon salmonis*. *J. Eukariot. Microbiol.* 42: 401-405.