

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2023

206

Alba Lucia Rey Castaño

Desarrollo de modelos
histopatológicos predictivos de
estreptococosis en tilapias
cultivadas

Director/es

Iregui Castro, Carlos Arturo
De Blas Giral, Ignacio

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE MODELOS
HISTOPATOLÓGICOS PREDICTIVOS DE
ESTREPTOCOCOSIS EN TILAPIAS CULTIVADAS

Autor

Alba Lucia Rey Castaño

Director/es

Iregui Castro, Carlos Arturo
De Blas Giral, Ignacio

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

2021

Tesis Doctoral

Título de la tesis:

Desarrollo de modelos histopatológicos
predictivos de estreptococosis en tilapias
cultivadas

Autora

Alba Lucía Rey Castaño

Directores

Carlos Arturo Iregui Castro
Ignacio de Blas Giral

Facultad de Veterinaria
2021

Universidad de Zaragoza

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

**Desarrollo de modelos
histopatológicos predictivos de
estreptococosis en tilapias cultivadas**

Memoria presentada por **Alba Lucía Rey Castaño**

Para optar al grado de Doctor

Mayo 2021



**Universidad
Zaragoza**

Dr. CARLOS ARTURO IREGUI CASTRO, Profesor Titular de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, y Dr. IGNACIO DE BLAS GIRAL, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, como Directores,

CERTIFICAN:

Que D^ª. ALBA LUCÍA REY CASTAÑO ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de modelos histopatológicos predictivos de estreptococosis en tilapias cultivadas” que se ajusta al Proyecto de Tesis presentado y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado

En Bogotá y Zaragoza, a 14 de mayo de 2021

Dr. Carlos Iregui

Dr. Ignacio de Blas



Agradecimientos

Los seres humanos que encontramos a lo largo de nuestra vida pueden ser demasiados, pero solo unos pocos son los que llegan a tener una verdadero aporte e influencia sobre ella y no siempre somos lo suficientemente agradecidos. He tenido la fortuna de encontrar varios de estos seres y es esta una oportunidad para decirles gracias por permitirme contar con su presencia a mi lado y especialmente durante este largo proceso de formación doctoral.

Quiero agradecerle al Dr. Carlos Iregui (el mejor patólogo que he conocido) de la Universidad Nacional de Colombia, no solo por compartir su conocimiento el cual ha sido parte fundamental para mi formación como profesional y como persona, sino por su infinita paciencia conmigo y detallismo con cada parte del trabajo realizado; gracias por mantener la fe en mi. También debo dar un especial agradecimiento al Dr. Ignacio de Blas (el mejor epidemiólogo que he conocido), de la Universidad de Zaragoza, inicialmente por su voto de confianza al formar parte de este proceso, el cual lo llevó finalmente a ser parte esencial para poder culminarlo satisfactoriamente, no menos importante ha sido su detallismo y dedicación.

Debo darle un reconocimiento y agradecimiento muy especial a mi esposo e hijas, por hacerme sentir siempre tan importante. Alejandro ha sido y será el amor de mi vida, he contado y sé que puedo contar para siempre con su apoyo y amor incondicional; mis hijitas hermosas, mis tesoros más preciados, gracias por su comprensión y por sus regaños también, pues increíblemente me empujaron adelante para llevar a buen término este trabajo.

No puedo dejar de mencionar a mi mamá, eterno apoyo y amor absoluto. Por supuesto la familia Camargo Plazas, extensión de mi familia, siempre atentos y confiados de mis capacidades. Muchas gracias en todos los sentidos.

Agradezco a todas aquellas personas que de una u otra forma, contribuyeron para el desarrollo y culminación de esta tesis doctoral.

Finalmente, pero no menos importante, gracias a Dios y al destino al poner a todas estas personas que acabo de mencionar en mi camino y por darme fortaleza espiritual cada nuevo día de vida.

Alguien dijo

“No hay mal que dure 100 años, ni tesista que los resista”,

Al final no fueron tantos.

Índice

Índice	I
Índice de Tablas	V
Índice de Figuras	IX
Resumen	XI
Summary	XV
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Acuicultura y enfermedad	3
2.1.1 Generalidades sobre producción acuícola	3
2.1.2. Las enfermedades como amenaza a la acuicultura	5
2.2. Las tilapias	9
2.2.1. Taxonomía	9
2.2.2. Hábitos alimenticios	11
2.2.3. Requerimientos ambientales para el cultivo de la tilapia	12
2.2.4. Reproducción	13
2.2.5. Sistemas de producción usados para el cultivo de la tilapia	14
2.2.6. Susceptibilidad a enfermedades	14
2.3. Estreptococosis en tilapias	16
2.3.1. Etiología	17
2.3.2. Epidemiología	17
2.3.3. Transmisión	18
2.3.4. Signos y lesiones	18
2.3.5. Diagnóstico	21
2.3.6. Prevención y control	22
2.4. Aproximación epidemiológica al manejo de la salud acuática	23
2.5. Aproximación histopatológica al diagnóstico y manejo de la salud acuática	25
3. Objetivos	29
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Metodología	31
4.1. Diseño del estudio	31
4.1.1. Tipo de estudio	31
4.1.2. Selección de la muestra para evaluación	31

4.1.3. Origen de la población estudiada	31
4.2. Procesamiento de las muestras	32
4.2.1. Evaluación clínica bajo anestesia	32
4.2.2. Procesamiento para bacteriología	32
4.2.3. Procesamiento para histopatología	32
4.3. Definición de lesiones en tilapia	33
4.3.1. Listado de lesiones	33
4.3.2. Valoración de severidad y extensión	37
4.3.3. Determinación de diagnósticos positivos a estreptococosis por <i>S. agalactiae</i> ST 260	38
4.3.4 Organización y tabulación de las calificaciones y el diagnóstico	39
4.4. Análisis de la información	41
4.4.1. Fase 1: Concordancia de las evaluaciones histopatológicas y del diagnóstico final de estreptococosis	41
4.4.2. Fase 2: Caracterización de lesiones histológicas y su asociación con diagnóstico de estreptococosis causada por <i>S. agalactiae</i> ST 260	42
4.4.2.1. Estimación de las frecuencias de las lesiones histológicas estratificadas según tipo de muestreo y diagnóstico de estreptococosis	42
4.4.2.2. Correlación entre las calificaciones para grado y extensión de las lesiones y asociación con el tipo de muestreo	42
4.4.2.3. Determinación de las lesiones correlacionadas con el diagnóstico de estreptococosis	43
4.4.3. Fase 3: Desarrollo de modelos histopatológicos para diagnóstico de estreptococosis causada por <i>S. agalactiae</i> ST 260	43
4.4.3.1. Construcción de modelos	43
4.4.3.2. Evaluación de la fiabilidad diagnóstica de los modelos	44
4.4.3.3. Validación de los modelos diagnósticos	45
5. Resultados y discusión	47
5.1. Diagnósticos positivos a estreptococosis por <i>S. agalactiae</i> ST 260	47
5.2. Fase 1: Concordancia y repetibilidad de la valoración de las lesiones observadas en el estudio	48
5.2.1. Concordancia de la calificación de las lesiones	48
5.2.2. Concordancia diagnóstica de estreptococosis	50
5.3. Fase 2: Caracterización de las lesiones y su asociación con diagnóstico de estreptococosis	51
5.3.1. Asociación de la frecuencia de las lesiones con el tipo de muestreo	51
5.3.2. Correlación entre severidad y extensión de las lesiones	58
5.3.3. Asociación de la frecuencia de las lesiones con el diagnóstico de estreptococosis causada por <i>S. agalactiae</i> ST 260	64
5.3.4. Lesiones correlacionadas con el diagnóstico de estreptococosis causada por <i>S. agalactiae</i> ST 260	71
5.4. Fase 3: Desarrollo de modelos histopatológicos para el diagnóstico de estreptococosis causada por <i>S. agalactiae</i> ST 260	76
5.4.1. Construcción de los modelos	76

5.4.1.1. Modelo general simple.....	77
5.4.1.2. Modelo general avanzado.....	80
5.4.1.3. Modelo aleatorio.....	83
5.4.1.4. Modelo dirigido.....	85
5.4.1.5. Resumen de los modelos.....	86
5.4.2. Evaluación de la fiabilidad diagnóstica de los modelos.....	90
5.4.3. Validación de los modelos diagnósticos.....	92
6. Conclusiones.....	97
7. Referencias bibliográficas.....	99
8. Anexos.....	117
Anexo 1. Frecuencias de lesiones y patógenos y concordancias entre dos evaluadores de una muestra preliminar (n=35).....	117
Anexo 1.A. Lesiones por órganos y sistemas.....	117
Anexo 1.B. Agentes patógenos por órganos y sistemas.....	120
Anexo 2. Correlaciones entre severidad y extensión de las lesiones evaluadas en los diferentes órganos y tejidos.....	121
Anexo 2.A. Lesiones branquiales.....	121
Anexo 2.B. Lesiones en ojo.....	125
Anexo 2.C. Lesiones en Sistema nervioso.....	126
Anexo 2.D. Lesiones en riñón.....	128
Anexo 2.E. Lesiones en corazón.....	130
Anexo 2.F. Lesiones en estómago.....	131
Anexo 2.G. Lesiones en intestino.....	133
Anexo 2.H. Lesiones en hígado.....	136
Anexo 2.I. Lesiones en hepatopáncreas y peritoneo/páncreas.....	137
Anexo 2.J. Lesiones en bazo.....	138
Anexo 3. Correlaciones entre diagnóstico de estreptococosis y la calificación de la severidad y la extensión de las lesiones en cada tipo de muestreo.....	141
Anexo 3.A. Lesiones branquiales.....	141
Anexo 3.B. Lesiones en ojo.....	144
Anexo 3.C. Lesiones en Sistema nervioso.....	145
Anexo 3.D. Lesiones en riñón.....	146
Anexo 3.E. Lesiones en corazón.....	148
Anexo 3.F. Lesiones en estómago.....	149
Anexo 3.G. Lesiones en intestino.....	150
Anexo 3.H. Lesiones en hígado.....	153
Anexo 3.I. Lesiones en hepatopáncreas y peritoneo/páncreas.....	154
Anexo 3.J. Lesiones en bazo.....	155
Anexo 4. Lesiones con correlación baja o muy baja con diagnóstico de e estreptococosis causada por <i>S. agalactiae</i> ST 260.....	157
Anexo 5. Lesiones incluidas en los modelos de regresión logística según la correlación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad o la extensión de las lesiones.....	159

Índice de Tablas

Tabla 1. Producción (en tm) de la acuicultura en Colombia entre 2013 y 2015	5
Tabla 2. Enfermedades identificadas como más problemáticas en el cultivo de las tres principales especies de peces en América del Norte	6
Tabla 3. Principales causas de sobrevivencia reducida en salmónidos cultivados en Noruega ...	7
Tabla 4. Tolerancia de las tilapias a oxígeno disuelto, amonio y pH	13
Tabla 5. Distribución poblacional de las tilapias analizadas en el presente estudio	32
Tabla 6. Lesiones correspondientes a disturbios circulatorios observadas en distintos órganos de acuerdo con los patrones de reacción propuestos por Bernet et al. (1999) ...	33
Tabla 7. Lesiones por cambios regresivos observadas en distintos órganos según los patrones de reacción de Bernet et al. (1999)	34
Tabla 8. Lesiones correspondientes a cambios progresivos observadas en distintos órganos de acuerdo con los patrones de reacción propuestos por Bernet et al. (1999)...	35
Tabla 9. Lesiones correspondientes a inflamación observadas en distintos órganos de acuerdo con los patrones de reacción propuestos por Bernet et al. (1999)	36
Tabla 10. Grado de severidad y extensión de las lesiones (Grupo de investigación en Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia)	37
Tabla 11. Clasificación del coeficiente d de Somers en valor absoluto	43
Tabla 12. Resumen de la concordancia entre evaluadores para la presencia de lesiones, su severidad y extensión (número de lesiones en cada categoría y porcentaje entre paréntesis)	49
Tabla 13. Resumen de la concordancia entre evaluadores para la presencia de patógenos y su grado de infección (número de patógenos en cada categoría y porcentaje entre paréntesis).....	50
Tabla 14. Lesiones muy frecuentes (>50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido).....	52
Tabla 15. Lesiones frecuentes (entre 25-50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido).....	53
Tabla 16. Lesiones con frecuencia moderada (entre 10-25% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido).....	54

Tabla 17. Lesiones poco frecuentes (entre 5-10% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)	55
Tabla 18. Lesiones muy poco frecuentes (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)	55
Tabla 19. Agentes etiológicos observados (>5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido).....	57
Tabla 20. Agentes etiológicos observados (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)	57
Tabla 21. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en branquias y su asociación con el tipo de muestreo	58
Tabla 22. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en el ojo y su asociación con el tipo de muestreo.....	59
Tabla 23. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en meninges y encéfalo y su asociación con el tipo de muestreo.....	59
Tabla 24. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en el riñón y su asociación con el tipo de muestreo.....	60
Tabla 25. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en corazón y su asociación con el tipo de muestreo.....	60
Tabla 26. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en estómago y su asociación con el tipo de muestreo.....	60
Tabla 27. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en intestino y su asociación con el tipo de muestreo	61
Tabla 28. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en hígado y su asociación con el tipo de muestreo	61
Tabla 29. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en hepatopáncreas y peritoneo/páncreas y su asociación con el tipo de muestreo	61
Tabla 30. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en bazo y su asociación con el tipo de muestreo.....	62
Tabla 31. Lesiones muy frecuentes (>50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)	65
Tabla 32. Lesiones frecuentes (25-50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)	66

Tabla 33. Lesiones con frecuencia moderada (10-25% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)	67
Tabla 34. Lesiones poco frecuentes (5-10% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)	68
Tabla 35. Lesiones muy poco frecuentes (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje (%) y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo).....	69
Tabla 36. Agentes etiológicos (>5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo).....	70
Tabla 37. Agentes etiológicos (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo).....	71
Tabla 38. Lesiones con correlación alta o moderada entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias del muestreo aleatorio	73
Tabla 39. Lesiones con correlación moderada entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias del muestreo dirigido	73
Tabla 40. Lesiones con correlación moderada entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias sin considerar tipo de muestreo	74
Tabla 41. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general simple.....	78
Tabla 42. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general simple: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis (- y +) con la calificación de severidad o extensión	79
Tabla 43. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado.....	81
Tabla 44. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis con la calificación de severidad o extensión según tipo de muestreo (Ale: aleatorio; Dir: dirigido).....	82
Tabla 45. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo aleatorio.....	83
Tabla 46. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo aleatorio: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis con la calificación de severidad o extensión.....	84

Tabla 47. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo dirigido.....	85
Tabla 48. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo dirigido: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis con la calificación de severidad.....	86
Tabla 49. Lesiones incluidas en cada uno de los modelos diagnósticos propuestos.....	87
Tabla 50. Áreas bajo la curva (AUROC), puntos de corte para considerar como positivo un resultado, sensibilidad (%) y especificidad (%) de cada uno de los modelos diagnósticos generados.....	92
Tabla 51. Peces evaluados para la validación de los modelos, puntos de corte para considerar como positivo un resultado, sensibilidad (%) y especificidad (%) obtenidas....	95

Índice de Figuras

Figura 1. Proporción de la acuicultura en la producción pesquera total	3
Figura 2. Producción de acuicultura en Colombia entre 2010 y 2016	4
Figura 3. <i>Tilapia zillii</i> (redbelly tilapia)	10
Figura 4. <i>Sarotherodon galilaeus</i> (Galilee tilapia)	10
Figura 5. <i>Oreochromis niloticus</i> (Nile tilapia)	11
Figura 6. <i>Oreochromis</i> spp. (hibrido de tilapia)	11
Figura 7. Tilapia roja con curvatura del cuerpo y nado errático que sugieren infección con <i>S. agalactiae</i>	19
Figura 8. Tilapia roja con exoftalmia bilateral causado por <i>S. agalactiae</i>	19
Figura 9. Corazón de tilapia. Epicardio con depósito de un material fibrinoide amarillento	20
Figura 10. Encéfalo de tilapia. Meninges con depósito de un exudado fibrinoide amarillento opaco	20
Figura 11. Severa meningoencefalitis necrótico hemorrágica con presencia de colonias bacterianas (flechas)	21
Figura 12. Severa epicarditis granulomatosa por <i>S. agalactiae</i>	21
Figura 13. Categorización de severidad y extensión en epicarditis	37
Figura 14. Formulario de Microsoft Access para la introducción de las calificaciones de severidad y extensión de cada pez identificado por número de placa histológica	39
Figura 15. Formulario de Microsoft Access para la introducción de los diagnósticos compatibles con las lesiones histológicas, de acuerdo con el criterio del evaluador	41
Figura 16. Hemorragias en branquias. 10x	88
Figura 17. Hiperplasia interlamelar. 10x	88
Figura 18. Detritus celulares en la luz branquial y presencia de algunos patógenos. 20x	88
Figura 19. Coroiditis. 40x	88
Figura 20. Meningitis. 4x	88
Figura 21. Granulomas en meninges y también en encéfalo. 4x	88
Figura 22. Necrosis en epicardio. 40x	89
Figura 23. Epicarditis. 4x	89

Figura 24. Miocarditis y epicarditis. 4x	89
Figura 25. Endocarditis. 20x	89
Figura 26. Granulomas en corazón. 4x	89
Figura 27. Muerte de leucocitos en bazo. 40x	89
Figura 28. Granulomas en bazo. 20x	90
Figura 29. Curvas ROC de los cuatro modelos generados por regresión logística.....	91
Figura 30. Herramienta usada para validar el modelo general el cual se aplica a tilapias de las cuales se desconoce el tipo de muestreo: aleatorio o dirigido. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación.....	93
Figura 31. Herramienta para validar el modelo general avanzado el cual se aplica a Tilapias que proceden bien sea de muestreos aleatorios o dirigidos. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación	94
Figura 32. Herramienta para validar el modelo aleatorio; se aplica a tilapias en aparición sanas que proceden de un muestreo al azar. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación.....	94
Figura 33. Herramienta para validar el modelo dirigido; se aplica a tilapias con signos, es decir que provienen de un muestreo dirigido. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación.....	95

Resumen

La acuicultura es un sistema de producción donde los organismos son sometidos a condiciones extremas facilitando la presentación de eventos patológicos donde a veces es difícil identificar los individuos afectados subclínicamente (aquellos infectados por agentes biológicos o factores abióticos que pueden presentar lesiones en sus tejidos, pero no manifestar signos clínicos de entidad alguna). Estos individuos son importantes en términos productivos y epidemiológicos, puesto que pueden ser fuente de infección para los sanos que conviven con ellos, o podrían ser bioindicadores de un proceso patológico inicial. En este sentido el grupo de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia (GIPV-UNC) se ha enfocado en el diagnóstico y sistematización de las lesiones y enfermedades de peces de cultivo, particularmente las tilapias (*Oreochromis spp.*), las cuales ocupan el primer lugar de la producción acuícola en Colombia y segundo en el mundo. En particular para esta especie, se han adelantado trabajos de descripción, interpretación, estandarización y correlación de distintas lesiones con los agentes etiológicos diagnosticados, destacándose el *Streptococcus agalactiae* ST260 por su relevancia sanitaria y económica que representa la estreptococosis para la industria del país. Para los mencionados estudios se ha empleado de manera primordial la técnica de histopatología.

El presente estudio partió de la hipótesis de que las tilapias en condiciones de cultivo presentan una cierta cantidad de cambios en distintos órganos que son específicos de estreptococosis por *S. agalactiae*, pero que no son suficientes para que un pez o una población manifiesten enfermedad clínica. El objetivo del estudio fue desarrollar modelos basados en lesiones histológicas para el diagnóstico y la predicción de esta enfermedad en tilapias. Para alcanzar el objetivo, el trabajo se organizó en tres etapas:

Fase 1: Concordancia y repetibilidad de la valoración de las lesiones: se desarrolló para darle consistencia y validez a los análisis histológicos. Se determinaron concordancias dicotómicas (presencia ausencia de lesión) y cuadráticas (calificación leve, moderado y severo) entre los evaluadores (estudiante y tutor experto), las cuales fueron en su mayoría aceptables, adecuadas o excelentes y en especial para aquellas alteraciones reportadas por la literatura como compatibles de la enfermedad. La concordancia diagnóstica de estreptococosis fue 0.729, considerada adecuada de acuerdo con la escala de Landis y Koch (1977).

Fase 2: Caracterización de lesiones y su asociación con diagnóstico de estreptococosis. Inicialmente se definieron de forma general los cambios histológicos en los tejidos de las tilapias incluidas en el estudio y se clasificaron como muy frecuentes (>50%), frecuentes

(25-50%), moderadamente frecuentes (10-25%), poco frecuentes (5-10%) y muy poco frecuentes (0.1-5%). Estos hallazgos se desglosaron en frecuencias según el tipo de muestreo aleatorio o dirigido y según el diagnóstico positivo o negativo a estreptococosis. En general, las lesiones fueron más frecuentes en los tejidos obtenidos de muestreos dirigidos que en los aleatorios, en especial aquellas con frecuencias >5%. Se observó similar comportamiento con las frecuencias de las alteraciones en los tejidos obtenidos de las tilapias positivas a la enfermedad comparadas con las negativas.

La mayoría de las alteraciones reconocidas en la literatura como compatibles con la enfermedad, tuvieron frecuencias generales moderadas o incluso poco frecuentes; no obstante fueron más frecuentes en muestreos dirigidos y en los peces positivos a la enfermedad: meningitis (63.6% y 74.7%, respectivamente), encefalitis (27.1% y 22.8%, respectivamente), necrosis en meninges (51.4% y 51.9%, respectivamente) y en encéfalo (30.8% y 28.4%, respectivamente), granulomas en meninges (12.1% y 14.8%, respectivamente), epicarditis (64.5% y 79.6% respectivamente), necrosis (55.1% y 53.7, respectivamente) y granulomas en corazón (18.7% y 27.2%, respectivamente), coroiditis (59.8% y 75.9%, respectivamente), granulomas en ojo (20.6% y 24.1%, respectivamente), necrosis en ojo (45.8% y 43.8%, respectivamente) y esplenitis (58.9% y 60.5%, respectivamente).

Dado que las lesiones fueron calificadas de acuerdo con los criterios de severidad (ausente 0, leve 1, moderada 2 o severa 3) y extensión (ausente 0, focal 1, multifocal 2, generalizado 3), se encontró que todas las alteraciones con frecuencias >5% (n=69) tuvieron una correlación estadística significativa entre los dos criterios. Esto quiere decir que las calificaciones de severidad de una lesión tienden a comportarse similar a las calificaciones de su extensión (cambios leves por lo general tienden a tener extensión focal y cambios severos a ser de extensión generalizada); por tanto, cualquiera de los dos criterios podría ser utilizado para evaluar estas lesiones. Este hallazgo simplifica el trabajo de histopatología puesto que ambos criterios son imprescindibles para calificar una lesión.

Posteriormente se estableció si el diagnóstico de estreptococosis estaba correlacionado (d de Somers) con la gravedad y/o extensión de las lesiones en cada tipo de muestreo. Cuando la muestra fue aleatoria, la correlación de la enfermedad fue alta con 10 alteraciones y moderada con 4. Destacan las lesiones inflamatorias (epicarditis, miocarditis, meningitis, encefalitis y ventriculitis), granulomatosas (en meninges y ojo) y necróticas (en meninges, cerebro, ojo, bazo, hepatopáncreas e hígado). En cambio, cuando el muestreo fue dirigido, la correlación de la enfermedad fue moderada con 9 alteraciones: las mismas que en la muestra aleatoria excepto por miocarditis, encefalitis, granulomas en las meninges y ojo, necrosis en el hepatopáncreas e hígado, que tuvieron una baja correlación con la estreptococosis.

Los anteriores resultados permiten inferir que la especificidad de las alteraciones

asociadas a estreptococosis, en términos poblacionales, no está relacionada con lesiones muy frecuentes, sino con las de menor frecuencia o incluso infrecuentes. Se sugiere entonces que la estreptococosis por *S. agalactiae* ST260 sigue un curso subagudo, con inflamación (mononuclear activa), necrosis y expresión de signos clínicos, y una forma crónica y asintomática (subclínica) con la formación de granulomas, aunque pueden existir superposiciones entre ambas formas. Buena parte de estos cambios, reconocidos por diversos autores de manera subjetiva-descriptiva como propios de la entidad en peces enfermos de manera natural o experimental, fueron confirmados estadísticamente en el presente estudio, situación que brinda confianza al emitir diagnósticos de enfermedad por *S. agalactiae* ST 260 en tilapias.

Fase 3: Desarrollo de modelos histopatológicos para el diagnóstico de estreptococosis causada por *S. agalactiae* ST 260. Acorde con los resultados mencionados previamente, se desarrollaron cuatro modelos histopatológicos para el diagnóstico de estreptococosis:

- 1. Modelo general simple**, que utiliza lesiones cuyas calificaciones de severidad o extensión fueron independientes del tipo de muestreo. Resultó menos fiable porque, a pesar su sensibilidad superior al 80%, la especificidad fue de 61.1%, lo que le resta confiabilidad a la prueba (detección de falsos positivos).
- 2. Modelo general avanzado**, que utiliza lesiones cuyas calificaciones de severidad o extensión estuvieron correlacionadas con el diagnóstico de la enfermedad en ambos muestreos; por tanto, será útil en sistemas de diagnóstico en tilapias de ambos muestreos. La sensibilidad y especificidad fueron superiores al 92%.
- 3. Modelo aleatorio**, que utiliza lesiones cuyas calificaciones de severidad o extensión estuvieron correlacionadas con el diagnóstico de la entidad en muestras aleatorias. Se recomienda para sistemas de monitoreo y vigilancia epidemiológica y ambos criterios de fiabilidad fueron mayores de 92%.
- 4. Modelo dirigido**, que utiliza lesiones cuyas calificaciones de severidad se correlacionaron con el diagnóstico de la entidad en muestreos dirigido. Éste resultó ser muy fiable, con una sensibilidad y especificidad del 100%.

Se ratificó en este estudio, matemáticamente, que las lesiones más significativas de estreptococosis son de tipo inflamatorio subagudo, localizadas en corazón, encéfalo (con predilección por las meninges), ojo y bazo. El apropiado manejo de toda la anterior información histológica, junto con la experiencia del diagnóstico y el monitoreo frecuente de las granjas, permitió el diseño de modelos diagnósticos predictivos de la enfermedad. Creemos que metodologías similares se pueden emplear para otras enfermedades de las tilapias y quizás en otras especies animales, y de esta forma implementar sistemas de vigilancia epidemiológica basados en el concepto de lesiones-enfermedad y no solo en el de etiología como es lo usual.



Summary

Aquaculture is a production system where organisms are exposed to extreme conditions leading to pathological events during which sometimes is difficult to identify subclinically affected individuals (those infected by biological agents or abiotic factors that could have lesions in their tissues but not manifest clinical signs of any disease). These individuals are important in productive and epidemiological terms, since they can be a source of infection for healthy fish living with them, or they could be bioindicators of an early-stage pathological process. In this sense, the Veterinary Pathobiology group of the National University of Colombia (GIPV UNC) is focused on the diagnosis and systematization of lesions and diseases of farmed fish, in particular tilapia (*Oreochromis* spp.), which ranks first place of aquaculture production in Colombia and second in the world. In particular, for this species, work has been done on the description, interpretation, standardization and correlation of different lesions with the etiological agents, highlighting *Streptococcus agalactiae* ST260, because streptococcosis has health and economic relevance for the country's industry. Histopathology technique has been used mainly to carry out these mentioned studies.

The present study arose from the hypothesis that tilapia under culture conditions present some tissue changes in different organs that are specific to streptococcosis caused by *S. agalactiae*, but that are not sufficient to manifest clinical disease by fish or a population; the aim of the study was to develop models for the diagnosis and prediction of this disease in tilapia based on histological lesions. To achieve the objective, the work was organized in three stages:

Stage 1: Agreement and repeatability of the injury assessment: it was developed to give consistency and validity to the histological analyzes. Dichotomous (presence of absence of injury) and quadratic (mild, moderate and severe score) concordances between the evaluators (student and expert tutor) were established. These were mostly acceptable, adequate or excellent and especially those alterations reported in the literature as compatible with the disease. The diagnostic agreement for streptococcosis was 0.729, considered adequate according to the Landis and Koch scale (1977).

Stage 2: Characterization of lesions and their association with diagnosis of streptococcosis. The histological changes in the tissues of the tilapia included in the study were defined in a general way and classified as very frequent (> 50%), frequent (25-50%), moderately frequent (10-25%), unfrequent (5-10%) and very infrequent (0.1-5%). These findings were separated into frequencies according to the type of

randomized or targeted sample and according to the positive or negative diagnosis of streptococcosis. In general, lesions were more frequent in tissues obtained from targeted rather than random samples, especially those with frequencies > 5%. Similar behavior was observed with the frequencies of tissue alterations of tilapia positive for the disease compared with negative ones.

Most of the alterations recognized in the literature as compatible with streptococcosis, had moderate or even infrequent general frequencies, however they were more frequent in targeted samplings and even more in fish positive for the disease: meningitis (63.6% and 74.7%, respectively), encephalitis (27.1% and 22.8%, respectively), necrosis in the meninges (51.4% and 51.9%, respectively) and in the brain (30.8% and 28.4%, respectively), granulomas in the meninges (12.1% and 14.8%, respectively), epicarditis (64.5% and 79.6% respectively), necrosis in the heart (55.1% and 53.7, respectively) and granulomas in the heart (18.7% and 27.2%, respectively), choroiditis (59.8% and 75.9%, respectively), granulomas in the eye (20.6% and 24.1%, respectively), necrosis in the eye (45.8% and 43.8%, respectively) and splenitis (58.9% and 60.5%, respectively).

Since that the lesions were graded according to the criteria of severity (absent 0, mild 1, moderate 2 or severe 3) and extension (absent 0, focal 1, multifocal 2, generalized 3), it was found that all changes with frequencies > 5% (n = 69) had a statistically significant correlation between the two criteria. This means that the severity scorings of an injury tend to behave similarly to the scorings of its extension (mild changes generally tend to have a focal extent and severe changes tend to be generalized); therefore, either of the two criteria could be used to assess these lesions. This finding simplifies the histopathology work since both criteria are fundamental to qualify a lesion.

Later it was established whether the diagnosis of streptococcosis was correlated (Somers's d) with the severity and/or extension of the lesions in each type of sampling. When the sample was random, the correlation of the disease was high with 10 alterations and moderate with 4: Inflammatory lesions (epicarditis, myocarditis, meningitis, encephalitis, ventriculitis), granulomatous (in meninges and eye) and necrotic (in meninges, brain, eye, spleen, hepatopancreas and liver) highlight. On the other hand, when the sampling was targeted, the correlation of the disease was moderate with 9 alterations: the same as in the random sample except for granulomas in the meninges and eye, encephalitis, myocarditis, necrosis in the hepatopancreas and liver, which had a low correlation with streptococcosis.

The previous findings allow us to infer that the specificity of the alterations associated with streptococcosis, in population terms, is not related to very frequent lesions but to less frequent or even infrequent lesions. Therefore, it is suggested that streptococcosis due to *S. agalactiae* ST260 follows a subacute course, with inflammation (active mononuclear), necrosis and expression of clinical signs, and a chronic and asymptomatic course with the formation of granulomas, although there may be overlaps between both

forms. A good part of these changes, recognized by various authors in a subjective-descriptive way as characteristic of the entity in naturally or experimentally diseased fish, were confirmed by statistics in the present study, a situation that provides confidence when making diagnoses of disease by *S. agalactiae* ST 260 in tilapia.

Stage 3: Development of histopathological models for the diagnosis of streptococcosis caused by *S. agalactiae* ST 260. In accordance with the previously mentioned results, four histopathological models were developed for the diagnosis of streptococcosis:

- 1. Simple general model**, uses lesions whose scores of severity or extension were independent of the type of sampling. This was less reliable because, despite its sensitivity higher than 80%, the specificity was 61.1%, which reduces the reliability of the test (detection of false positives).
- 2. Advanced general model**, uses lesions whose severity or extension scores were correlated with the disease in random and targeted samplings; therefore, it will be useful in diagnostic systems for tilapia from both samplings. Sensitivity and specificity were greater than 92%.
- 3. Random model**, uses lesions whose severity or extent scores were correlated with the diagnosis of the entity in random samples. It is recommended for epidemiological monitoring and surveillance systems. The reliability criteria were greater than 92%.
- 4. Targeted model**, this uses lesions whose severity scores were correlated with the diagnosis of the entity in targeted samplings. This was very reliable, with a sensitivity and specificity of 100%.

This study mathematically confirmed that the most significant lesions of streptococcosis are of the subacute inflammatory type, located in the heart, brain (with a predilection for the meninges), eye and spleen. The appropriate management of all the previous histological information, together with the experience of diagnosis and frequent monitoring of the farms, allowed the design of predictive diagnostic models of the disease. We believe that similar methodologies can be used for other tilapia diseases and perhaps other animal species, and thus implement epidemiological surveillance systems based on the concept of injury-disease and not only on the etiology as usual.

1 Introducción

La cría de animales acuáticos destinados al consumo humano, como en el caso de otras especies cultivadas con el mismo fin, se lleva a cabo en sistemas de producción altamente complejos en términos espaciales y temporales donde los individuos son sometidos a condiciones extremas, lo que hace difícil distinguir entre salud, desempeño subóptimo y afección subclínica en las poblaciones cultivadas. Si bien en dichas condiciones es posible identificar los individuos que sufren distintas patologías, no sucede lo mismo con aquellos afectados subclínicamente, es decir, los que pueden estar infectados por agentes biológicos o ser afectados por factores abióticos y que pueden presentar lesiones aunque no en grado suficiente para manifestar signos o síntomas clínicos evidentes de entidad alguna; estos individuos conforman una parte importante de la población en términos productivos y epidemiológicos, puesto que por un lado pueden ser fuente de infección para los individuos sanos que conviven con ellos, pero de otro podrían ser útiles como bioindicadores de un proceso patológico silente en curso o en sus inicios. Para el caso concreto de este estudio, las especies en consideración serán los peces y más concretamente las tilapias de cultivo (*Oreochromis* spp.), las cuales ocupan el primer lugar de producción en Colombia y segundo en el mundo.

El grupo de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia (GIPV-UNC) trabaja desde hace varios años en el diagnóstico y sistematización de las lesiones y enfermedades de peces destinados al consumo humano y de aquellos con propósitos ornamentales, para ello ha empleado de manera primordial la técnica de histopatología. Para el caso particular de tilapia son varios los trabajos que se han adelantado en la descripción, interpretación, estandarización y correlación de distintas lesiones con los agentes etiológicos diagnosticados. Dentro de estos, *Streptococcus agalactiae* ha recibido la mayor atención dada la relevancia sanitaria y económica que representa la estreptococosis, la enfermedad causada por esta bacteria, a la industria del país.

Los estudios iniciales demostraron la coincidencia de las lesiones debidas a *S. agalactiae* con aquellas documentadas en la literatura internacional, y solo unas pocas nuevas fueron aportadas por nuestro grupo. Posterior a ello se inició la sistematización de dichas lesiones en peces aparentemente sanos y en otros tomados durante brotes de enfermedad; se estableció que, aunque el patógeno afectaba un amplio número de órganos de las tilapias, tres de ellos: encéfalo, corazón y ojo eran los que con mayor frecuencia se veían involucrados y los que mostraban las alteraciones más graves. Un hallazgo significativo adicional de estos trabajos fue que, si se tomaban como referencia los cambios de los tres anteriores órganos como elemento indicativo de la presencia de

estreptococosis, la técnica de histología de rutina resultó bastante mas sensible para el diagnóstico de la entidad que la microbiología o aun la inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra la bacteria. Otro hallazgo relevante fue que los animales clínicamente sanos tenían el mismo tipo de lesiones con la misma distribución orgánica, pero de menor gravedad. Se concluyó que la histopatología sometida a procesos de “objetivación”, esto es, sometida a sistematización de las lesiones de gran número de animales con la misma enfermedad, además de ello sujeta a análisis intersubjetivo y semicuantitativo era una técnica adecuada para ser usada como referencia, especial pero no únicamente, en estudios de vigilancia epidemiológica, de diagnóstico de rutina, y de investigación de campo y experimental. En este contexto se determinaron prevalencias de la estreptococosis y algunas tendencias en cuanto a factores de riesgo relacionadas principalmente con grupos etarios y calidad del agua. En principal conclusión, las investigaciones previas demostraron de manera fehaciente que ni la infección, ni las lesiones equivalen a enfermedad clínica, y que el *dictum* de la teoría del iceberg en epidemiología se cumple plenamente.

Si bien las técnicas moleculares modernas para el diagnóstico patológico son una herramienta muy rápida, precisa y económica en la demostración de la presencia de agentes infecciosos en los peces, también es cierto que, en el contexto del concepto de enfermedad en sentido estricto, o aún más, en el estado “subclínico” de las mismas, la definición del significado de la presencia de un microorganismo específico se hace difícil de interpretar tanto en términos poblacionales como individuales.

Sobre estos principios se ha privilegiado el abordaje integral de la sanidad de los sistemas de producción de tilapia, esto incluye desde las herramientas diagnósticas de la enfermedad clínica o las alteraciones subclínicas, pasando por el análisis del sistema productivo y ambiental, hasta las medidas de control y prevención. En concordancia, para esta investigación se ha seleccionado la técnica de histopatología como herramienta para el diagnóstico del estado sanitario clínico y subclínico de las tilapias en Colombia, y la estreptococosis como modelo para implementar un índice predictivo basado en las lesiones características de esta enfermedad. Esto permitirá monitorear y detectar cambios en el estado de enfermedad de los peces, que a su vez permitirá intervenciones tempranas para minimizar el impacto sanitario.

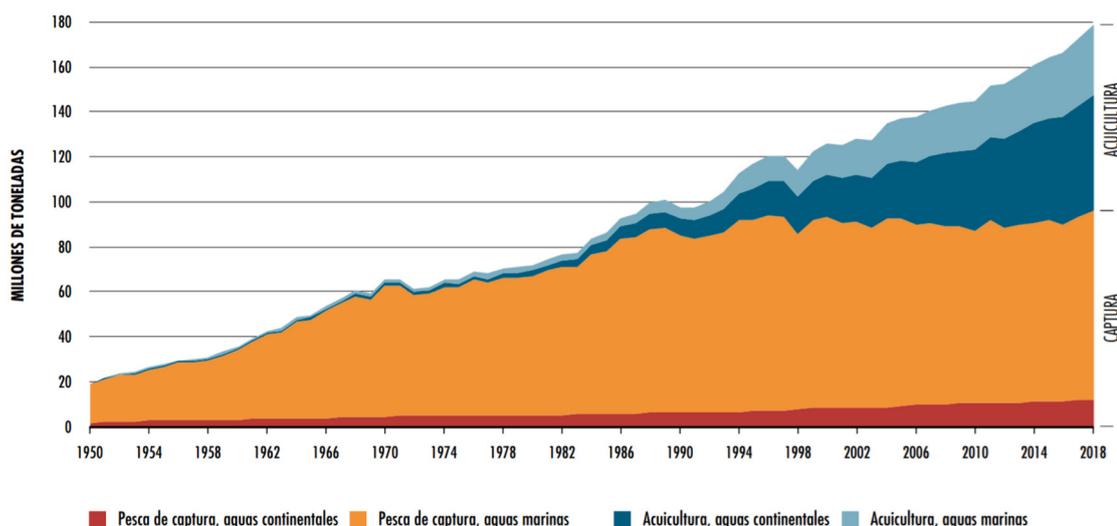
2 Revisión bibliográfica

2.1. Acuicultura y enfermedad

2.1.1. Generalidades sobre producción acuícola

La acuicultura es uno de los sectores productores de alimento de más rápido crecimiento en el mundo. El desarrollo de la acuicultura mantiene una tendencia creciente de forma ininterrumpida en el contexto del suministro total de pescado. De acuerdo con las últimas estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la contribución de la acuicultura a la producción total mundial de peces de captura y cultivados en 2018 (178.5 millones tm) alcanzó el 46% (82.1 millones tm), lo que representa un aumento del 18% si se compara con el 31.1% del total de la producción en el año 2004 (Figura 1). Se estima que actualmente más de 622 especies acuáticas son cultivadas en el mundo, aunque no todas con la misma intensidad. Se espera que el sector acuático continúe aumentando su contribución a la producción de alimentos y refuerce su papel en la seguridad alimentaria, en tanto que además ofrece oportunidades para aliviar la pobreza, aumentar el empleo y el desarrollo de las comunidades, así como reducir la sobreexplotación de los recursos acuáticos naturales (FAO, 2020).

Figura 1. Proporción de la acuicultura en la producción pesquera total



Fuente: FAO, 2020

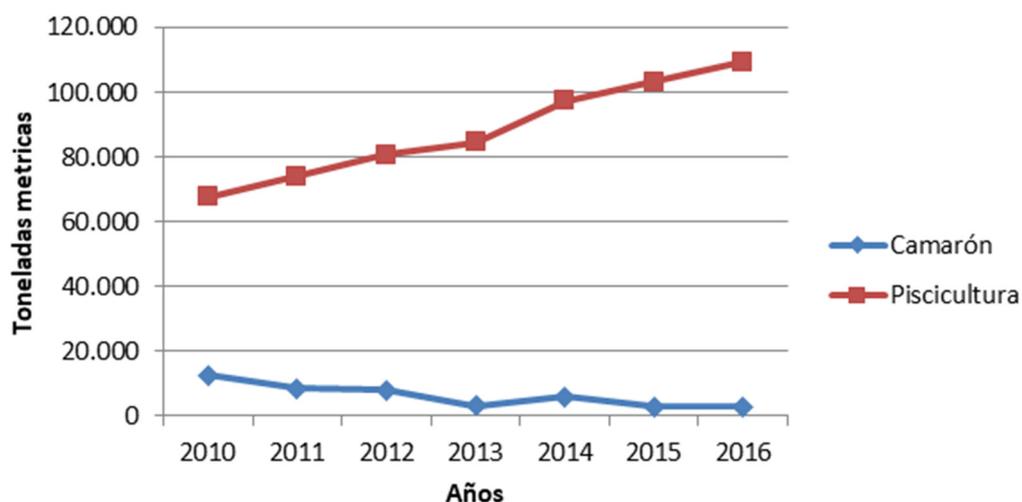
Contrariamente a este gran potencial de especies cultivadas y otras cultivables, la mayoría de la producción total está basada en un pequeño número de ellas. Las tilapias

(*Oreochromis* spp.) son las especies de peces con más amplia distribución geográfica en el mundo ya que más de 35 países y territorios han registrado su cultivo según las bases de datos de la FAO (FAO, 2014; 2020). Actualmente los cíclidos son el segundo grupo de peces cultivado en el mundo después de los ciprínidos con una producción de 5.5 millones de tm en el año 2018 (FAO, 2020). A pesar de las pérdidas significativas por enfermedades (alrededor de 300 000 tm, principalmente debidas a infecciones por *Streptococcus* spp.) reportadas en diferentes países, se espera que la producción en 2019 alcance los 6.5 millones de tm, lo cual representaría un crecimiento del 4% con respecto al 2018, de acuerdo con la encuesta anual de producción de la Alianza Global de Acuicultura (GAA, *Global Aquaculture Alliance*) (Bondad-Reantaso, 2017; Tveternas et al., 2019).

Los diez principales países que lideraron la producción de tilapia para el año 2017 fueron: China, Indonesia y Egipto que explican más del 66% de la producción de tilapia (3.9 millones de tm), el restante porcentaje lo aportan en orden descendente Bangladesh, Vietnam, Filipinas, Brasil, Tailandia, Colombia y Uganda (FAO, 2019).

En Colombia, la producción acuícola total para 2016 fue de 112 116 tm, de las cuales a la piscicultura corresponde el 97.5% (Figura 2) (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), 2017). La producción piscícola colombiana se basa en el cultivo de varias especies, algunas nativas como el bocachico (*Prochilodus magdalenae*) y la cachama (*Piaractus brachypomus*) y otras introducidas al país hace muchos años como la tilapia y la trucha (*Onchorhynchus mykiss*); sin embargo, la oferta nacional depende en su mayor parte de la tilapia. Mediante estimativo basado en la información del Consejo Nacional de la Acuicultura del MADR, con datos para 2018, el 61.1% correspondió a la producción de tilapias roja (*Oreochromis* spp.) y plateada (*Oreochromis niloticus*), 17.5% a la producción de cachamas, 18.1% a la de trucha y 3.3% a la de otras especies nativas y exóticas continentales (CNA-MADR, 2018) (Tabla 1).

Figura 2. Producción de acuicultura en Colombia entre 2010 y 2016



Fuente: MADR, 2017

Tabla 1. Producción (en tm) de la acuicultura en Colombia entre 2013 y 2015

Especie	2014	2015	2016	2017	2018
Tilapia	60 798	63 157	66 946	73 641	77 933
Cachama	24 611	20 777	22 024	22 455	22 332
Trucha	10 409	15 828	16 778	20 226	23 038
Otras	1 459	3 351	3 552	3 907	4 142
Total	97 277	103 114	109 300	120 230	127 445

Fuente: CNA-MADR, 2018

En Colombia el cultivo de tilapia se desarrolla en dos sistemas de producción diferentes: estanques en tierra y jaulas flotantes. El departamento del Huila, principal núcleo productor del país, aportó el 45% en 2015. Este departamento cuenta con cultivadores que implementan ambos tipos; y la mayor producción proviene de la Represa de Betania, donde se utiliza el sistema de jaulas flotantes (Merino et al., 2013; CNA-MADR, 2018).

2.1.2. Las enfermedades como amenaza a la acuicultura

Como consecuencia del crecimiento de la industria, las enfermedades son una de las principales amenazas para el crecimiento de la acuicultura. Una amplia variedad de factores ha contribuido al aumento de problemas sanitarios que enfrenta el sector, el cual durante los últimos años se ha expandido, intensificado y diversificado; entre ellos se cuentan los movimientos de animales y sus productos (reproductores, huevos, alevines y alimentos) apoyados por la globalización y la liberación de los mercados mundiales. Estas circunstancias han acelerado la diseminación accidental y la emergencia de enfermedades en nuevas poblaciones y regiones geográficas (Subasinghe, 2005; Brugere et al., 2017; FAO, 2018).

Ejemplos de serias pérdidas económicas debidas a diseminación de enfermedades en animales acuáticos se reportan en muchos países y en diversas especies desde la década de 1990 cuando los sistemas sanitarios no estaban preparados, lo que fue causa de daños desastrosos a tal punto, que se puso en riesgo la existencia de diferentes sistemas productivos. Ejemplos del grave impacto que tienen las enfermedades en animales acuáticos incluyen: la enfermedad de la mancha blanca (*White Spot Disease*) en camarones cultivados en todo el mundo (Calderón et al., 2000), brotes de síndrome de mortalidad temprana (EMS) en camarones cultivados en Asia y México (Cuéllar, 2013), o la anemia infecciosa del salmón en Chile (Asche et al., 2009). El impacto de las enfermedades podría ser peor si las especies afectadas fueran las más importantes para el consumo humano y la seguridad alimentaria, como las carpas y las tilapias. Por ello son urgentes medidas de bioseguridad globales con especial atención al movimiento de animales acuáticos vivos, pero también al alimento vivo. Aunque esta translocación de patógenos debida a movimientos de sus hospederos no es nueva, ha ganado la atención reciente en muchas regiones dada la evidencia de las serias consecuencias socio

económicas, sobre el medio ambiente y el comercio internacional (Arthur y Ogawa, 1996; Subasinghe et al., 2001; Bondad-Reantaso et al., 2005; FAO, 2014).

La industria camaronera se ha visto afectada por varias enfermedades de origen viral, entre las que se pueden señalar: síndrome de la gaviota (Stern, 1995), síndrome del virus del Taura (SVT) (Brock et al., 1995), virus de la mancha blanca (WSSV) (Calderón et al., 2000; FAO, 2018); también enfermedades de origen bacteriano como el síndrome de mortalidad temprana (EMS) causado por una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* y renombrada como enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*). Los impactos del AHPND incluyen pérdidas de producción, disminución de ingresos y beneficios para los pequeños productores y empresas comerciales, mayores precios del camarón debido a la escasez de suministros, e impactos sobre el comercio. En Vietnam, unas 39 000 ha se vieron afectadas en 2011 con esta entidad; Malasia estimó pérdidas de producción de 100 millones de dólares estadounidenses (USD) también en el año 2011; mientras que los cálculos de la GAA indicaron que fueron 1 000 millones USD; en Tailandia, los informes de las empresas del sector privado indicaron un descenso anual de la producción del 30-70%. La enfermedad ha sido reportada en China, Malasia, México, Tailandia y Vietnam (Cuéllar, 2013; FAO, 2013). De otra parte, agentes parasitarios como el *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ha emergido como un patógeno serio asociado a bajo crecimiento en camarones cultivados en varios países asiáticos ocasionando graves pérdidas económicas (Rajendran et al., 2016).

Dentro de los problemas de origen sanitario de las principales especies de peces producidas en América del Norte las enfermedades infecciosas son el mayor obstáculo para el crecimiento de la acuicultura (Tabla 2) (Georgiadis et al., 2001).

Tabla 2. Enfermedades identificadas como más problemáticas en el cultivo de las tres principales especies de peces en América del Norte

Patógenos	Salmón	Trucha	Bagre del canal
Virus	IHNv Rhabdovirus ISAv Orthomyxovirus	-	CCv Herpevirus
Bacterias	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Flexibacter maritimus</i> <i>Piscirickettsia salmonis</i> <i>Renibacterium salmoninarum</i> <i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Flavobacterium</i> spp. <i>F. psychrophilum</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i> <i>F. columnare</i>
Hongos	-	-	<i>Branchiomyces</i> sp. <i>Saprolegnia</i> sp.
Parásitos	<i>Kudoa thyrsites</i> <i>Loma salmonae</i>	-	<i>Henneguya</i> sp. <i>Bulbophorus confusus</i>

Fuente: Adaptado de Georgiadis et al., 2001

El costo directo atribuido a la mortalidad en trucha arcoíris se valora en un 10% del total de la producción. Los peces que sobreviven a las enfermedades infecciosas crecen más lentamente y sucumben a situaciones estresantes secundarias (ej. oxígeno disuelto bajo), y son más susceptibles a otros patógenos (Roberts y McKnight, 1976); además, estos animales ocupan espacio que podría ser mejor utilizado por individuos sanos (Rosenlund, 1977).

La situación sanitaria de salmónidos y truchas en Noruega es generalmente buena. Muchas enfermedades bacterianas pueden producir pérdidas sustanciales pero la mayoría de ellas están controladas. Por el contrario, los virus continúan causando serios problemas y acarrear importantes pérdidas financieras. Las principales enfermedades parecen ser la anemia infecciosa viral del salmón (ISA), la enfermedad del páncreas (PD), la inflamación del músculo esquelético y del corazón (HSMI) relacionada con un orthoreovirus piscícola denominado PRV y el síndrome de cardiomiopatía del salmón (CMS) (Tabla 3) (Palacios et al., 2010; Rodger et al., 2014; Di Cicco et al., 2017; Marine Harvest, 2017; FAO, 2018). Las enfermedades bacterianas más comunes parecen ser la furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), la enfermedad bacteriana renal (*Renibacterium salmoninarum*), la septicemia rickettsial del salmón (SRS) (*Piscirickettsia salmonis*) y la infección por *Moritella viscosa*, que causa úlceras en invierno (Skjelstad et al., 2007). La franciselosis (*Francisella piscicida*) también se reporta en bacalao de cultivo (Olsen et al., 2006; Nylund et al., 2006; Ottem et al., 2008). El piojo del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*) es todavía un problema global (Costello, 2009).

Tabla 3. Principales causas de sobrevivencia reducida en salmónidos cultivados en Noruega

Origen infeccioso	Origen no infeccioso
Inflamación del músculo esquelético y del corazón (HSMI)	Bloom de algas
Infecciones branquiales	Tratamientos
Síndrome de cardiomiopatía del salmón (CMS)	Pobre desempeño productivo
Enfermedad del páncreas (PD)	Manipulación

Fuente: Marine Harvest, 2017

Distintas enfermedades han afectado a la industria del salmón en Chile como la franciselosis (Birkbeck et al., 2007), la SRS y la necrosis pancreática infecciosa (NPI), entre otras. A partir de 2007 hubo una diseminación de *Caligus* o piojo de mar y una serie de brotes del virus de la ISA, causando grandes mortalidades y preocupación acerca del estado sanitario de la producción de salmónidos. En 2008 se presentaron otros brotes de esta enfermedad, pero se consideraron casos aislados y no se creyó que esto fuera un problema para la industria en general; sin embargo, sólo a finales de este año, la mayoría de las empresas comenzaron a considerar ISA como un desafío que requería una acción conjunta de la industria; la producción comenzó a ser duramente golpeada a partir de 2009 y se estimó que el valor de producción se reduciría en más de

2 000 millones USD hacia el año 2011 (Asche et al., 2009; FAO, 2018). Otras enfermedades ya reportadas en Noruega también han hecho aparición en Chile como la HSMI relacionada también con el virus PRV en salmón del Atlántico (Godoy et al., 2016).

También en Asia y Latinoamérica, donde las tilapias son unas de las especies más explotadas, las enfermedades son reconocidas como una de las mayores amenazas a la producción, al desarrollo sostenible y la expansión de la acuicultura. En los últimos años se le presta más atención a la identificación de los agentes etiológicos implicados en las epidemias (Tan et al., 2006). Por ejemplo, la franciselosis se considera una enfermedad emergente en los cultivos de tilapia en el mundo, especialmente en Asia y en América Latina (Centro y Sudamérica), pero este patógeno también afecta otras especies de peces tanto silvestres como de cultivo. Entre 2001 y 2004 en Taiwán se identificaron nuevas especies de *Francisella* a partir de lesiones granulomatosas en tilapias cultivadas (Hsieh et al., 2006) pero también se reportaron estas nuevas especies en Costa Rica (Soto et al., 2009), Japón, Hawai (Birkbeck et al., 2011), Tailandia, Indonesia (Nguyen et al., 2016) y Brasil (Assis et al., 2017). *Francisella noatunensis* fue reportada desde 2015 afectando tilapias cultivadas en jaulas en Honduras con mortalidades entre 50 y 85%; la enfermedad cursa con organomegalia y granulomas en distintos órganos como bazo y riñón, pero también en hígado y corazón (Soto et al., 2019).

Las estreptococosis se reconocen como una amenaza importante a la piscicultura ocasionando mortalidad masiva y grandes pérdidas económicas en el mundo (Agnew y Barnes, 2007; Liao et al., 2020). Varias especies de estreptococos son las responsables de distintas enfermedades muy similares como *Streptococcus dysgalactiae*, *S. parauberis*, *Vagococcus salmoninarum* y *Lactococcus garvieae*, pero tal vez las más significativas son debidas a *S. agalactiae* y *S. iniae*, que afectan a varias especies ícticas de cultivo y de manera notoria las tilapias (*Oreochromis* spp.) (Eldar y Ghittino 1999; Evans et al., 2002; Kayansamruaj et al., 2017).

En el año 2014 emergió una enfermedad de origen viral en tilapias de cultivo y silvestres a la cual se la denominó virus de la tilapia del lago (TiLV), también se le conoce como Tilapinevirus y hasta el momento es el único miembro dentro de este género. Se trata de un virus RNA, y se han documentado brotes de la enfermedad y el aislamiento del patógeno en los últimos años en Asia (China, India, Tailandia, Indonesia e Israel), África (Egipto) y Latinoamérica (Ecuador y Colombia). Se calcula que las pérdidas económicas causadas por el agente pueden llegar hasta 7 500 millones USD anuales (Bacharach et al., 2016; Bondad-Reantaso, 2017; del Pozo et al., 2017; Dong et al., 2017; Nicholson et al., 2017; Behera et al., 2018); por su patogenicidad y virulencia se considera como una amenaza global a la industria de la tilapia (FAO, 2018; Jansen et al., 2019).

De acuerdo con FAO (2018) las limitaciones para manejar las enfermedades de la acuicultura incluyen: dificultad para acceder a las técnicas de diagnóstico, existencia de patógenos crípticos y organismos benignos que pueden volverse patógenos cuando se

introducen en nuevos hospedadores y nuevos entornos, escasas opciones para el control de las enfermedades de animales acuáticos, aparición de síndromes de enfermedades multifactoriales y frecuentes infecciones subclínicas, estado no domesticado de la mayoría de las especies acuáticas de cultivo y escasez de información sobre el estado de salud de los animales acuáticos, entre otras.

2.2. Las tilapias

Las tilapias (*Oreochromis* sp.) son peces pertenecientes a la familia Cichlidae originaria de África (Trewaves, 1983) donde se reportan los primeros cultivos hacia 1920 y desde allí ha sido establecida en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo. En más de 100 países las condiciones son favorables para su reproducción y crecimiento (El-Sayed, 2020), y su gran capacidad de adaptación a distintos hábitats la ha convertido en la actualidad en la segunda especie con mayor producción en el mundo siendo China el país con la producción más alta (FAO, 2019).

2.2.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica de la tilapia es confusa y sufre continuos cambios debidos en primer lugar a la similitud entre diferentes especies, a la superposición de características morfológicas y además porque muchas de las especies hibridan libremente en la naturaleza. Las tilapias son un grupo de peces de agua dulce pertenecientes a la familia Cichlidae (Lim y Webster, 2006; El-Sayed, 2020):

Reino: Animal

Phylum: Chordata

Grupo: Craniata (Vertebrata)

Superclase: Pisces

Clase: Osteichthyes

Orden: Perciformes

Familia: Cichlidae

Géneros: *Oreochromis*

Sarotherodon

Tilapia

En un comienzo el género *Tilapia* fue dividido en dos subgéneros según su comportamiento reproductivo y hábitos alimenticios: *Tilapia* y *Sarotherodon*. Posteriormente, el subgénero *Sarotherodon* fue elevado a género y luego subdividido en dos géneros: *Sarotherodon* y *Oreochromis* (El-Sayed, 2020).

De acuerdo con Froese y Pauly (2018), en la actualidad se reconocen tres géneros. El

género *Tilapia* con 7 especies que se caracterizan por realizar los desoves en el sustrato de las masas de agua. La especie más representativa del género es *T. zillii* (Figura 3).

Figura 3. *Tilapia zillii* (redbelly tilapia)



Fuente: Luc de Vos, 1999

En género *Sarotherodon* se produce la incubación oral de los huevos fertilizados y el cuidado parental de los alevines lo realiza el macho o ambos reproductores (machos y hembras). De las 13 especies de este género la más representativa es *Sarotherodon galilaeus* (Figura 4).

Figura 4. *Sarotherodon galilaeus* (Galilee tilapia)



Fuente: Golani, 2013

El género *Oreochromis* incluye 32 especies, y se caracteriza porque la incubación oral de los huevos y el posterior cuidado parental corre a cargo de las hembras. Se cultivan con éxito unas diez especies, de las cuales la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) es la más importante en el mundo (El-Sayed, 2020) (Figura 5). También se cultiva un híbrido (tilapia roja) (Figura 6) explotada por su coloración atractiva, tolerancia a condiciones de

manejo proveniente de líneas mejoradas de las cuatro especies más importantes del género *Oreochromis* (*O. niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus* y *O. hornorum*) (Torres et al., 2010).

Figura 5. *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia)



Fuente: Ueberschaer, 1999

Figura 6. *Oreochromis* spp. (híbrido de tilapia)



Fuente: National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards, 2013

2.2.2. Hábitos alimenticios

Las tilapias son herbívoras/omnívoras que aprovechan bien la productividad primaria de los cuerpos de agua (fitoplancton, zooplancton) y también los detritus de los fondos; algunas especies como *O. aureus* también pueden consumir residuos de plantas y *O. mossambicus* consumen además larvas de otros peces. Esto favorece los costos de producción relacionados con la alimentación y no afecta la calidad de la proteína utilizable para consumo humano. Los patrones de alimentación son irregulares y dependen de factores como tamaño, especie, época del año, tiempo del día, fotoperiodo, profundidad del agua, localización geográfica y hábitat. Todas estas

variables se deben tener en cuenta para balancear las dietas y establecer los regímenes de alimentación (frecuencia, cantidad, calidad) en los sistemas de producción (Lim y Webster, 2006; El-Sayed, 2020).

2.2.3. Requerimientos ambientales para el cultivo de la tilapia

Las tilapias se cultivan desde formas semiintensivas hasta superintensivas donde las condiciones ambientales, las densidades y estrategias de manejo son variadas (El-Sayed, 2020). La calidad del agua cambia a medida que avanza el periodo de cultivo de tal forma que su manejo es un factor muy importante para el éxito del cultivo, así como para entender los diferentes parámetros y sus interrelaciones los cuales tienen efectos sobre el crecimiento y la salud de los peces.

Temperatura. Es uno de los principales factores en los cultivos de estos peces puesto que afecta a todos sus procesos fisiológicos (crecimiento, reproducción y metabolismo). Las tilapias toleran un rango amplio de temperaturas entre 20 y 35°C cuyo óptimo está entre 25-30°C (Xie et al., 2011); sin embargo, ligeras variaciones pueden tener efecto sobre el crecimiento y el desempeño general de los individuos (El-Sayed, 2020). Las tilapias no crecen a temperaturas menores a 16°C, y por lo general no sobreviven después de varios días con temperaturas menores a 10°C (Pillay, 1993; Lim y Webster, 2006).

Oxígeno disuelto (OD). Es uno de los factores más limitantes y afecta a la alimentación, el crecimiento, el metabolismo y la inmunidad innata (Tran-Duy et al., 2012; Abdel-Tawwab et al., 2015). El OD a su vez es afectado por la fotosíntesis de los organismos vegetales en el agua, la respiración y el metabolismo de los peces y otros organismos acuáticos. También le afecta la temperatura del agua: a mayor temperatura menor disponibilidad de OD, lo cual lleva a que los organismos acuáticos incrementen la tasa respiratoria, el metabolismo y el consumo de oxígeno para suplir los requerimientos tisulares. Las tilapias soportan niveles de OD de hasta 0.1-0.5 mg/L durante periodos cortos de tiempo siempre y cuando puedan subir a la superficie del agua de lo contrario morirán (Taylor, 2019; El-Sayed, 2020) (Tabla 4).

Compuestos nitrogenados (amonio y nitritos). Los desechos nitrogenados son eliminados a través de las branquias en forma de amonio ionizado (NH_4 , no tóxico) y no ionizado (NH_3 , tóxico para los peces). El amonio es convertido a nitrito (NO_2) y luego a nitrato (NO_3) por bacterias nitrificantes que crecen sobre la materia orgánica suspendida en el agua. La toxicidad del amonio depende del OD, pH y CO_2 en el agua, así, la baja temperatura, el bajo OD y CO_2 , y el pH fuera del rango de tolerancia exacerbaban la toxicidad (Boyd, 2000; El-Sayed, 2020). La exposición a concentraciones de amonio tóxico por encima de 0.5 mg/L de forma prolongada lleva a lesiones en el tejido branquial, pobre crecimiento y aumento en la mortalidad especialmente en tilapias jóvenes, pero también conlleva a una inhibición en la tasa de incubación de los huevos

(El-Greisy et al., 2016). Mortalidades masivas de tilapias ocurren en pocos días en aguas con concentraciones de amonio no ionizado mayores a 2 mg/L; sin embargo, cuando se aclimatan gradualmente a niveles subletales por debajo de 1 mg/L), algunos peces pueden sobrevivir (Tabla 4) (Lim y Webster, 2006).

Los nitratos son poco tóxicos para los peces, pero las altas concentraciones y por periodos prolongados pueden inducir inmunodepresión y mortalidad en los peces. Por el contrario, los nitritos tienen capacidad tóxica porque disminuyen la eficiencia de la hemoglobina para transportar oxígeno de tal manera que se alteran distintos procesos fisiológicos de sistemas como el inmune, el respiratorio, el endocrino, también los procesos de excreción y en últimas retarda el crecimiento (Lim y Webster, 2006; El-Sayed, 2006; Xu et al., 2016).

pH. Las tilapias toleran un amplio rango de pH (entre 5 a 11) (Tabla 4); con todo, la exposición prolongada a bajo o alto pH lleva a cambios de comportamiento, daño al epitelio branquial y de la piel, se disminuye la excreción de nitrógeno, hay pérdida de electrolitos y aumento de la mortalidad (Boyd, 2000; El-Sayed, 2020).

Tabla 4. Tolerancia de las tilapias a oxígeno disuelto, amonio y pH (Fuente: El-Sayed, 2020)

Especie de tilapia	Oxígeno disuelto (mg/L)		Amonio no ionizado (mg/L)		pH	
	Mínimo	Óptimo	Rango	Óptimo	Rango	Óptimo
<i>O. niloticus</i>	0.1-0.5	5.5-6.5 ¹	Hasta 7.4* Hasta 1.0**	<0.1	3.7-11.0	5.5-9.0
<i>O. aureus</i>		>3.0	1.93-3.14*			
<i>O. mossambicus x O. niloticus</i>			6.6*			

* CL50 alevinos; ** CL50 larvas

Salinidad. A pesar de que las tilapias son peces de agua dulce son capaces de tolerar un amplio rango de salinidad del agua. La mayoría puede crecer y reproducirse en aguas salobres y otras aun en condiciones de salinidad alta, aunque el desempeño productivo no será el óptimo (El-Sayed, 2020). La tolerancia a la salinidad depende de la especie, líneas, tamaños, adaptación, factores ambientales y localización geográfica (Suresh, 1992; Vinatea, 2002; Lim y Webster, 2006).

2.2.4. Reproducción

La madurez sexual de las tilapias en general es temprana, alrededor de los 4 a 6 meses de edad cuando alcanzan un peso promedio de 40 g y las condiciones ambientales son favorables (24°C o más). Una hembra puede realizar hasta 12 desoves al año con una cantidad entre 200 y 2 000 huevos en cada uno. Debido al comportamiento de cuidado parental en la boca, el número de huevos es pequeño comparado con otras especies de peces. El número de huevos es proporcional al peso corporal de la hembra entre 1 000 a

1 500 huevos por 600 a 1 000 g de peso (Suresh, 2000; Lim y Webster, 2006).

El proceso de reproducción se inicia cuando el macho establece un territorio excavando un nido en el fondo del estanque a donde atrae a la hembra. Después de un breve cortejo la hembra deposita los huevos en el nido y el macho inmediatamente los fertiliza. Según los hábitos de cada especie el macho o la hembra o ambos recogen los huevos en su boca hasta que eclosionan las larvas las cuales se alimentan de su saco vitelino durante aproximadamente 15 días según la temperatura del ambiente. Posteriormente, la hembra reanuda su alimentación y su ciclo de reproducción (Suresh, 2000).

2.2.5. Sistemas de producción usados para el cultivo de la tilapia

Cultivo semiintensivo. Esta forma de producción de peces (y otros organismos acuáticos) se asimila a las condiciones naturales para lo cual se emplea el alimento natural mediante la fertilización de estanques o combinado con suplementación alimenticia. Es una producción de bajo costo debido a una baja inversión pero que contribuye a proporcionar de forma continua una fuente de alimentos de calidad especialmente en áreas rurales en países en desarrollo. En el caso de las tilapias estos sistemas de producción, bien sea en mono o policultivo, son comunes en el sudeste asiático y en la mayoría de los países de Latinoamérica; se utilizan estanques en tierra los cuales deben ser adecuados: limpieza, desinfección, llenado con agua abonada con fertilizantes orgánicos o inorgánicos para producción primaria de plancton, al menos una semana antes de introducir los alevinos. Se recomienda obtener alevinos saludables de preferencia certificados según los protocolos de bioseguridad. Después de 4 a 6 meses de cultivo los animales podrán alcanzar un peso promedio de 200 y 400 g (Hussain, 2004; Lim y Webster, 2006).

Cultivos intensivos y superintensivos. Se desarrollan en estanques en tierra, piletas de concreto o jaulas flotantes en grandes cuerpos de agua naturales o artificiales con buena corriente de agua cuya calidad debe ser constantemente monitoreada (Hussain, 2004). Dado que se cultivan densidades mayores y se requiere mejor calidad del agua muchas veces se utilizan equipos de aireación.

Las densidades oscilan entre 10 000 y 35 000 peces/Ha, se espera alcanzar 350-380 g por pez en 6-7 meses. El alimento es únicamente de origen comercial (Fitzsimmons y Watanabe, 2010).

2.2.6. Susceptibilidad a enfermedades

La tasa de crecimiento del cultivo de la tilapia y su continua introducción a nuevas áreas geográficas refleja el futuro positivo de esta especie como fuente de proteína animal en especial en países en desarrollo e incentiva la investigación en diferentes áreas como la genética, el mejoramiento de la calidad de la carne, los sistemas de producción y la

sanidad a fin de aumentar la productividad y sostenibilidad de los cultivos (El-Sayed, 2020). En un comienzo se pensaba que las tilapias eran más resistentes a las enfermedades comparadas con otras especies de peces cultivados; como ha sucedido con otras especies en los inicios de su industrialización, en tilapias la experiencia es la misma, que en la medida en que se intensifica la producción, la productividad y la tecnificación estos peces se vuelven susceptibles tanto a enfermedades infecciosas como no infecciosas.

Con relación a las enfermedades infecciosas es importante aclarar la diferencia entre los términos infección y enfermedad. La infección se refiere a la presencia de un microorganismo en un huésped sin que se observen signos de la enfermedad, mientras que la enfermedad se refiere a la expresión de manifestaciones clínicas por parte del huésped como resultado de la presencia y crecimiento de ese microorganismo dentro de sus tejidos (Iregui et al., 2014).

Enfermedades virales. En los últimos años se han comenzado a reportar enfermedades virales como la causada por el denominado virus de la tilapia del lago (TiLV) o *Tilapia tilapinevirus*, la necrosis nerviosa viral (VNN) causada por un Betanodavirus y enfermedades causadas por algunos géneros de la familia Iridoviridae como *Megalocytivirus*, *Lymphocystivirus* y *Ranavirus* (Prihartini et al., 2015; Subramaniam et al., 2016; Bondad-Reantaso, 2017; del Pozo et al., 2017; Machimbirike et al., 2019).

Enfermedades bacterianas. Los patógenos bacterianos más comunes en tilapias incluyen *Streptococcus* spp., *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas* spp., *Edwardsiella* spp., *Francisella* spp., *Yersinia ruckeri* (Rey et al., 2002; Iregui et al., 2004; Eissa et al., 2008; Klesius et al., 2008; Delamare-Deboutteville et al., 2015; Huicab-Pech et al., 2016).

No se conoce un mapa detallado de la distribución y la frecuencia de las distintas enfermedades bacterianas de la tilapia en el mundo. En Colombia nuestro grupo GIPV-UNC elaboró un detallado mapa de las entidades que hasta 2003 se habían diagnosticado en estos peces, un estudio en curso actualiza estos hallazgos y pronto se darán a conocer (Iregui et al., 2004). Dentro del grupo de los agentes bacterianos más frecuentes se reporta *S. agalactiae*, pero también se diagnostica con regularidad enfermedad por *Edwardsiella tarda/anguillarum*, *F. columnare* y *Aeromonas hydrophila* (Rey et al., 2002; Jiménez et al., 2007; 2007a; Iregui et al., 2012; Piñeros et al., 2018). Brasil, que es uno de los países de mayor producción de la especie en el mundo, reporta enfermedades causadas por *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *A. hydrophila*, *F. columnare* y *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (denominada Fno).

Las infecciones pueden presentarse solas o en coinfección y esto se relaciona con diferentes factores de riesgo como los cambios de temperatura debidos a las transiciones estacionales (época seca o de lluvia) y las densidades altas de cultivo, entre otros (Assis et al., 2017).

Un trabajo reciente da cuenta de enfermedad por *S. iniae* por primera vez en tilapias de cultivo en México (Ortega et al., 2018). La edwardsielosis causada por *E. ictaluri* es común en el bagre del canal (*Ictaluris punctatus*), pero no en otras especies ícticas; sin embargo, en 2012 se reportó este patógeno en tilapias de Centroamérica y más recientemente en países asiáticos (Soto et al., 2012; Dong et al., 2019). La especie de *Edwardsiella* más frecuentemente reportada afectando a tilapias es *E. tarda*, pero últimamente aumentan los reportes de infecciones por *E. anguillarum* tanto en América como en Asia (Armwood et al., 2019; Vaz Rodrigues et al., 2019; Oh et al., 2020).

Enfermedades parasitarias. Las tilapias son susceptibles a la mayoría de parásitos protozoarios y crustáceos de aguas cálidas. Ciliados como *Ichthyophthirius multifiliis* y *Trichodina* spp. aparecen en gran número especialmente en peces estresados confinados en aguas con alta carga de materia orgánica. También son frecuentes los monogeneos, trematodos digeneos, y parasitismos intestinales como coccidiosis (Rey et al., 2002; Fitzsimmons y Watanabe, 2010; Iregui et al., 2004; 2019).

Enfermedades micóticas. Aunque las tilapias tienen tolerancia a aguas frías, bajo estas condiciones son susceptibles a hongos externos como *Saprolegnia* spp. Las infecciones generalmente son crónicas, afectan la piel y branquias y en algunas ocasiones también los huevos en sistemas de incubación artificial (Fitzsimmons y Watanabe, 2010).

2.3. Estreptococosis en tilapias

Las estreptococosis se han convertido en unas de las enfermedades bacterianas más severas en los cultivos de tilapias tanto de agua dulce como marina. Se trata de enfermedades septicémicas causadas por distintas especies de *Streptococcus* que incluyen *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. iniae* (Evans et al., 2006; Costa et al., 2014; Zamri-Saad et al., 2014; Ortega et al., 2016; 2018; Campos et al., 2018). El primer reporte de estreptococosis en tilapias lo hizo Al-Harbi en 1994 en Arabia Saudí y actualmente se documenta este patógeno en muchos países como EE.UU., Israel, Japón, China, Kuwait, Tailandia, Honduras, Brasil, Perú, Colombia, entre otros (Jiménez et al., 2007; Klesius et al., 2008; Figueiredo et al., 2012; Iregui et al., 2014; Liu et al., 2014; Barato et al., 2015; Ortega et al., 2016; 2018).

Streptococcus agalactiae es el principal miembro del género que afecta los cultivos de tilapia en todo el mundo en los que causa altas mortalidades que pueden estar por encima del 70% (Perera et al., 1997; Shoemaker et al., 2001; Klesius et al., 2008). *Streptococcus agalactiae* es hasta ahora la única especie de *Streptococcus* aislada en granjas de tilapia en Colombia (Jiménez et al., 2007).

2.3.1. Etiología

Streptococcus spp. son microorganismos Gram positivos con forma esférica u ovoide (0.5-2.0 μm de diámetro) y se organizan en pares o cadenas cuando crecen en medio de cultivo líquido; son inmóviles, no forman esporas, producen gas a partir de la fermentación de ácido láctico, son oxidasa y catalasa negativos, anaerobios facultativos que requieren medios enriquecidos para su crecimiento (Amal y Zamri-Saad, 2011).

Streptococcus agalactiae es un diplococo, único miembro del grupo B Lancefield (GBS, *Group B Streptococcus*), que comúnmente crece en medios de cultivo con sangre en los cuales hacen hemólisis que puede ser β en la mayoría de los casos, α hemolíticos (en aproximadamente, el 1% de los casos) o no hemolíticos (Edwards y Nizet, 2011).

Todos los aislamientos hechos por el grupo GIPV-UNC en Colombia han resultado no hemolíticos y pertenecen al grupo Ib, ST-260, CC552 (Delannoy et al., 2013; Iregui et al., 2014; Barato et al., 2015).

2.3.2. Epidemiología

Como cualquier otra infección la estreptococosis tiene muy pocas limitaciones de fronteras geográficas como no sean las comerciales y de especie; el primer caso de la enfermedad se documentó en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en Japón por Hoshina et al., (1958). Desde entonces ha habido brotes en muchas partes del mundo (Sudáfrica, Italia, Reino Unido, EE.UU., Corea del Sur, Singapur, Canadá, Venezuela, Israel, Australia, España y Colombia), los cuales son cada vez más frecuentes (Kitao, 1993; Amal y Zamri-Saad, 2011).

Puede afectar a varias especies de peces como la tilapia (*Oreochromis* spp.) (Eldar et al., 1995; Perera et al., 1997; Bowser et al., 1998; Pulido et al., 2004); el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Nieto et al., 1995; Doménech et al., 1996); la trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Bragg y Broere 1986; Ceschia et al., 1992; Doménech et al., 1993; Yoshida et al., 1996); la seriola coreana o *yellowtail* (*Seriola quinqueradiata*) (Yoshida et al., 1997), el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Kim y Lee, 1994), entre otros.

Para 1996, las pérdidas económicas mundiales en especies piscícolas cultivadas debidas a infección con *Streptococcus* spp. sobrepasaron los 150 millones de USD. En EE.UU. las pérdidas asociadas con estos microorganismos en cultivos de tilapia excedieron los 10 millones de USD (Shoemaker y Klesius 1997). En Italia e Israel desde el año de 1997 las infecciones por cocos Gram positivos son consideradas las enfermedades más importantes en la época de verano en granjas productoras de trucha, con cerca de 50 000 y 8 000 tm/año en pérdidas, respectivamente (Bercovier et al., 1997). Kusuda y Salati (1993) reportan que en Japón para 1989, de una producción de 336 000 tm (2 840 millones de USD) provenientes de la acuicultura, 20 600 tm (166 millones de USD) se perdieron a causa de enfermedades infecciosas bacterianas, principalmente por los

géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Las condiciones ambientales adversas como bajo OD, altas temperaturas y concentraciones de amonio y en general una calidad del agua pobre se consideran predisponentes para la presentación de la estreptococosis (Rodkhum et al., 2011; Yanong y Francis-Floyd, 2002; Zamri-Saad et al., 2014; Amal et al., 2015).

2.3.3. Transmisión

Se considera que la transmisión horizontal del patógeno es el mecanismo más común de diseminación. Las bacterias se excretan en las heces de los peces enfermos e infectados, posiblemente sobreviven en el agua y son infectivas para otros individuos. Los peces muertos y moribundos se consideran también fuente de los microorganismos hacia el agua y de allí a otros peces dentro del mismo cuerpo de agua (Hernández et al., 2009; Iregui et al., 2014). De acuerdo con Nguyen et al. (2002), los peces infectados llevados a las granjas son el factor más importante para la introducción de esta enfermedad.

Estudios previos del grupo GIPV-UNC no han podido demostrar la infección o enfermedad de alevinos de menos de 20 g de peso, esto ha permitido formular la hipótesis de que no existiría transmisión vertical de esta bacteria (Jiménez et al., 2007; Hernández et al., 2009; Jiménez et al., 2011); se ha propuesto que la ausencia de desarrollo de la infección ni de la enfermedad en este grupo etario, se debería más a las condiciones de manejo de los peces de estas edades antes que a una resistencia intrínseca *per se*, y que la infección y la enfermedad son más comunes en animales mayores debido al manejo intensivo a que son sometidos estos individuos (Hernández et al., 2009; Jiménez et al., 2011; Iregui et al., 2014).

2.3.4. Signos y lesiones

La forma aguda de la infección en tilapias cursa con altas mortalidades, por encima del 50% en un periodo de tiempo corto de 3 a 7 días, mientras que la forma crónica puede prolongarse por varias semanas (incluso meses), pero con un bajo porcentaje de mortalidad (Osman et al., 2017; Iregui et al., 2019). Owatari et al. (2020) sugieren la presentación de una forma subclínica que explicaría mortalidades súbitas y recurrentes con compromiso de funciones fisiológicas, pero sin manifestaciones clínicas externas en los peces.

La estreptococosis es una enfermedad invasiva con signos típicos de letargia, pérdida del apetito, nado errático que puede ser en espiral o en giros (Figura 7), distensión del abdomen, curvatura de la columna vertebral, rigidez, exoftalmia uni o bilateral (Figura 8), hemorragias oculares, opacidad corneal y hemorragias en la base de las aletas; algunos animales pueden presentar dificultad respiratoria (Yanong y Francis-Floyd, 2002; Pulido et al., 2004; Zhou et al., 2008; Amal et al., 2015; Saleh et al., 2017; Vásquez et al., 2019).

Figura 7. Tilapia roja con curvatura del cuerpo y nado errático que sugieren infección con *S. agalactiae*



Fuente: Imagen cortesía de GIPV-UNC

Figura 8. Tilapia roja con exoftalmia bilateral causado por *S. agalactiae*



Fuente: Imagen cortesía de GIPV-UNC

En el examen macroscópico de las tilapias afectadas se observa fluido sanguinolento en la cavidad abdominal, el hígado puede estar pálido y agrandado o presentar hemorragias, también puede haber esplenomegalia, el intestino puede contener exceso de moco pardo-rojizo, en el epicardio hay acúmulo de un material fibrinoide amarillento (Figura 9) y se aprecia una apariencia parduzca o hemorrágica del tejido retrobulbar y de las meninges por acúmulo de un exudado de la misma naturaleza (Figura 10) (Pulido et al., 2004; Filho et al., 2009; Hernández et al., 2009; Rodkhum et al., 2011; Amal et al., 2015; Vásquez et al., 2019).

Figura 9. Corazón de tilapia. Epicardio con depósito de un material fibrinoide amarillento



Fuente: Imagen cortesía de GIPV-UNC

Figura 10. Encéfalo de tilapia. Meninges con depósito de un exudado fibrinoide amarillento opaco

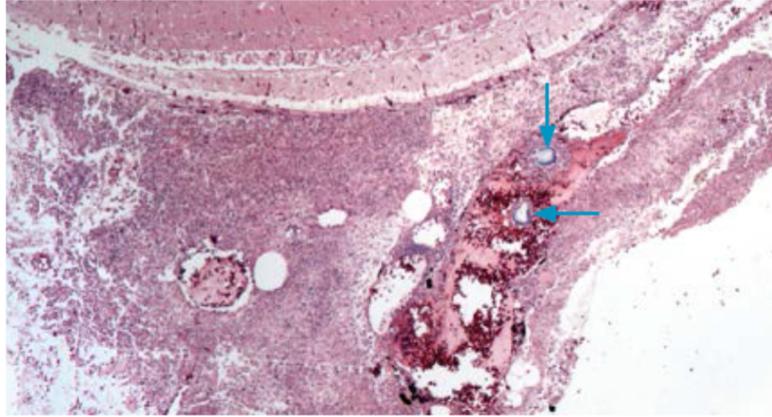


Fuente: Imagen cortesía de GIPV-UNC

La principal respuesta inflamatoria microscópica en buena parte de los órganos, en la mayoría de los casos severos en Colombia, es una reacción granulomatosa con predominio de macrófagos, en menor proporción linfocitos y en ocasiones presencia de células Mast, antes conocidas como células granulares eosinofílicas en los peces. A pesar de que la mayor parte de los órganos pueden estar afectados, el encéfalo, el corazón y el globo ocular son los que con mayor regularidad se ven involucrados. En el encéfalo las lesiones incluyen severa meningoencefalitis hemorrágica (Figura 11) y/o granulomatosa con extensas áreas de malacia; en el corazón la capa más afectada es el epicardio y en menor medida el miocardio; la coroides, esclerótica y otras estructuras del globo ocular pueden verse comprometidas. El carácter de las lesiones es similar en todos los órganos y van desde hemorragias hasta procesos fibrinosos y granulomatosos (Figura 12). En mucha menor medida lesiones similares se pueden encontrar en otros órganos como el riñón y

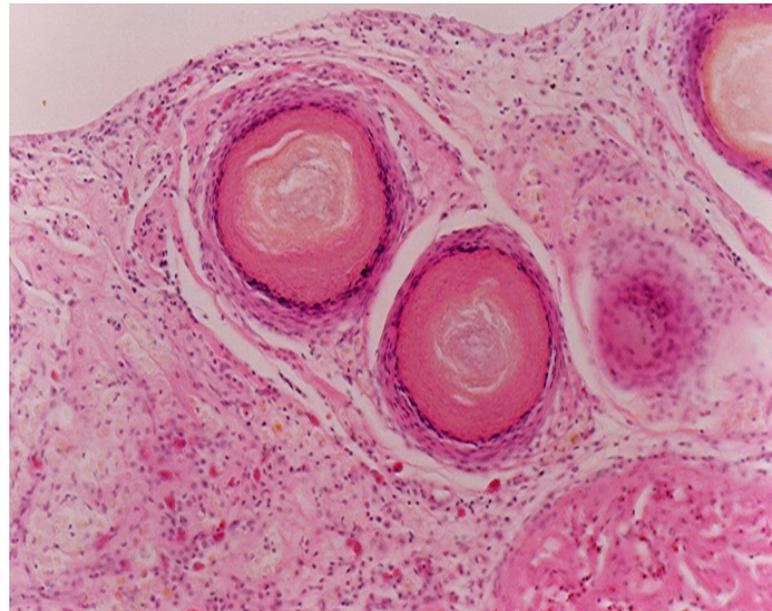
el bazo. Rara vez se puede ver gran cantidad de cocos Gram positivos en medio de las lesiones (Pulido et al., 2004; Hernández et al., 2009; Vásquez et al., 2019). Otros autores describen lesiones similares (Chen et al., 2007; Filho et al., 2009; Su et al., 2017).

Figura 11. Severa meningoencefalitis necrótico hemorrágica con presencia de colonias bacterianas (flechas)



Fuente: Iregui et al., 2019

Figura 12. Severa epicarditis granulomatosa por *S. agalactiae*



Fuente: Imagen cortesía de GIPV-UNC

2.3.5. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la infección por *S. agalactiae* y la estreptococosis se recomienda iniciar con una visita a la granja para observar a los animales en su medio y seleccionar a aquellos que muestren algunos de los signos clínicos antes anotados; posterior a la eutanasia de individuos enfermos (en piscicultura se recomienda no examinar peces muertos) se deben examinar de manera rápida y de inmediato tomar las muestras para aislamiento bacteriológico, para histopatología los tejidos se fijan en formalina

tamponada al 3.7%. Sobre la base de los signos clínicos y los hallazgos macroscópicos se establece un diagnóstico presuntivo (Iregui et al., 2014).

El cerebro, región retroorbitaria, corazón, riñón, bazo e hígado son los órganos y tejidos que mejores resultados dan para bacteriología (Sugiyama y Kusuda, 1981; Hernández et al., 2009). Los medios de cultivo recomendados son el agar sangre bovina-triptosa, agar infusión cerebro-corazón, agar nutriente suplementado con sangre de conejo y caldo Todd-Hewitt. Los aislamientos deben ser cocos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativos y ser no hemolíticos o β hemolíticos en placas de agar con sangre. La identificación de la bacteria mediante los perfiles bioquímicos es difícil dado que no todos los aislamientos dentro del género son incluidos en las bases de datos lo cual dificulta su discriminación (Rahimi-Kia y Mehrabi, 2013).

Las técnicas moleculares como PCR y secuenciación del gen 16S ribosomal RNA (rRNA) y 16S-23S rRNA son útiles para el diagnóstico de especies de *Streptococcus* (Berridge et al., 2001; Jiménez et al., 2011; Rahimi-Kia y Mehrabi, 2013); sin embargo, los resultados de PCR al igual que los de microbiología, deben ser un apoyo a histopatología que es la única técnica con la cual se puede asegurar que realmente se está frente a enfermedad por *S. agalactiae* y no solo se trata de una infección; el anterior es el protocolo que se sigue para el diagnóstico definitivo en el Laboratorio de Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. Además, la histopatología por medio de la técnica de hematoxilina-eosina ha demostrado que tiene una mayor sensibilidad y especificidad que la microbiología y aunque la misma inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra para el diagnóstico de enfermedad por *S. agalactiae* (Hernández et al., 2009; Iregui et al., 2014).

2.3.6. Prevención y control

A pesar de que la principal vía de transmisión de *S. agalactiae* es la horizontal, hasta el momento no ha resultado fácil la demostración del papel que juega el agua o los lodos como vehículo del microorganismo; algunos estudios de nuestro grupo GIPV-UNC no pudieron demostrar la presencia de la bacteria en ninguno de los anteriores medios a pesar de que se emplearon técnicas de alta sensibilidad como la PCR. Sin embargo, otro estudio, usando biosensores amperométricos, permitió la detección tanto en agua como en lodos, aunque no se obtuvieron aislamientos microbiológicos de las muestras analizadas (Jiménez et al., 2007; Vásquez et al., 2017). De forma interesante, para el caso de otras especies del género *Streptococcus* como *S. iniae* que afectan peces sí se han podido detectar en agua y lodos (Nguyen y Kanai, 1999; Nguyen et al., 2002). Por consiguiente, las recomendaciones siguen una serie de medidas con alto contenido de sentido común para prevenir el ingreso de *S. agalactiae* a las granjas y disminuir la presentación de la enfermedad, entre ellas: adquirir alevinos provenientes de granjas libres de la enfermedad, establecer cuarentena a nuevos individuos, reducir la densidad

de cultivo, evitar la sobrealimentación, mantener separadas las aguas y utensilios de manejo para las distintas actividades del cultivo, reducir la manipulación y el transporte de los animales al mínimo posible, retirar los peces enfermos y muertos permanentemente, alimentar con raciones libres del patógeno y desarrollar códigos de buenas prácticas sanitarias (Inglis et al., 1993; Klesius et al., 2008; Iregui et al., 2014; Zamri-Saad et al., 2014).

Para el tratamiento y control de la enfermedad se usan antibióticos como la oxitetraciclina la cual parece ser efectiva contra *S. iniae* (Darwish y Griffin, 2002). Otros antibióticos como eritromicina, lincomicina y doxiciclina, entre otros, han mostrado alguna eficacia frente a *Streptococcus* spp. pero al dejar de suministrarlos la enfermedad rápidamente aparece nuevamente indicando que estos tratamientos no son capaces de eliminar completamente la bacteria (Darwish y Hobbs, 2005).

La utilización de vacunas también es una alternativa para controlar algunos *Streptococcus*. Algunos estudios con *S. agalactiae* y *S. iniae* muestran algún grado de efectividad al comparar los porcentajes de supervivencia en desafíos experimentales comparando peces inmunizados frente a no inmunizados (Eldar et al., 1997; Evans et al., 2004; Li et al., 2015). A pesar de los resultados positivos de las vacunas, parece ser que la dificultad mayor radica en el sistema de vacunación, el cual consiste en inyectar miles de peces muy pequeños uno a uno por vía intraperitoneal la cual ha sido la ruta con mayor éxito en los ensayos; la vía oral no ha dado buenos resultados, aunque en términos prácticos sería la más apropiada por lo cual es necesario desarrollar estrategias y herramientas para superar los anteriores inconvenientes (Iregui et al., 2014).

2.4. Aproximación epidemiológica al manejo de la salud acuática

El ambiente acuático es un ecosistema complejo que hace difícil distinguir entre salud y desempeño subóptimo. Durante los brotes de enfermedad, la causa es muchas veces difícil de discernir y usualmente es el resultado final de una serie de eventos ligados que implican factores ambientales, condiciones individuales y poblacionales, presencia de un agente infeccioso y/o prácticas incorrectas de cría y manejo. En adición, el control de las enfermedades de los animales acuáticos puede ser problemático debido a muchos factores que incluyen la amplia variedad de especies cultivadas, el rango y complejidad de los ambientes usados, la intensificación, el tipo de manejo y la variedad de enfermedades que afectan a estas especies. De este modo, se debe desarrollar un nuevo enfoque para gestionar la sanidad de los sistemas acuáticos para remplazar la aproximación del diagnóstico tradicional enfocada al patógeno (Subasinghe, 2005).

El objetivo del manejo sanitario es mantener un buen estatus de salud asegurando un óptimo de productividad y evitar la presentación de enfermedades. En acuicultura, el riesgo económico asociado con enfermedad es alto y representa una pérdida potencial

en producción a través de mortalidad y morbilidad. Además, el costo de tratar enfermedades cuando éstas ya se han establecido es alto y los tratamientos son muchas veces iniciados bastante tarde y por ello raramente son efectivos. Por tanto, un programa de manejo sanitario para animales acuáticos debe ser una estrategia global cuyo fin es prevenir enfermedades antes de que ocurran. Entonces un prerrequisito es un buen entendimiento de las enfermedades que pueden ocurrir en una especie de pez particular. Así, debe ponerse especial atención a los estudios epidemiológicos y al diagnóstico de las enfermedades (Tan et al., 2006; World Bank Group, 2014; Asefa y Abunna, 2018).

Una de las aproximaciones más efectivas a la prevención de enfermedades es la implementación de prácticas de bioseguridad que, aunque mejor desarrolladas en los sistemas de producción terrestre, ya han comenzado a implementarse en acuicultura. La utilización de principios epidemiológicos y una aproximación lógica y científica para identificar y manejar riesgos son dos de los componentes más importantes de un programa de bioseguridad efectivo (Georgiadis et al., 2001; Subasinghe, 2005; Dewey, 2008; FAO, 2018). Aunque apenas es un concepto nuevo para el manejo de la sanidad acuícola, el uso de la epidemiología en el entendimiento de importantes enfermedades de peces (Lilley et al., 1998; Morgan, 2001) y camarones (Corsin et al., 2001; Mohan et al., 2002) está aumentando (Peeler y Taylor, 2011). Esta herramienta mejoraría significativamente el manejo sanitario, el análisis de riesgos y el control de enfermedades (Oidtmann et al., 2013).

La epidemiología utiliza la población como unidad de estudio, donde una aproximación bidireccional (es decir, desde la población hacia el individuo, el órgano, el tejido, la célula y la molécula, pero también desde la población hacia la granja al distrito, la provincia, la región y el país) permite una visión más integral y estructurada para el entendimiento de un proceso de enfermedad (Thrusfield, 1995) y facilita el desarrollo de estrategias de control y prevención. El control de estas situaciones de riesgo exige una permanente alerta por parte del piscicultor y de los profesionales sanitarios en acuicultura.

El manejo de la salud de los peces en una granja requiere diseñar un programa para determinar el estatus sanitario y disponer de sistemas de registro de la mortalidad y de episodios de enfermedad; esto permite monitorear y detectar cambios en el estado de salud/enfermedad de los peces, lo que a su vez permite intervenciones tempranas para minimizar el impacto sanitario. Es indispensable identificar, reducir o eliminar factores de riesgo que podrían hacer los peces más susceptibles a la enfermedad. La identificación de estos factores de riesgo permitirá tomar acciones antes de que ocurra el efecto negativo sobre la salud. Estos factores incluyen las formas de manejo, la alimentación, la manipulación de los peces, el manejo de calidad del agua, la vacunación, el manejo de los reproductores, etc. (Georgiadis et al., 2001; Bartley et al., 2006; Oidtmann et al., 2013). Por estos motivos existe un interés creciente en la comunidad internacional

dedicada a la producción y aprovechamiento de organismos acuáticos por el uso de herramientas epidemiológicas para el entendimiento de la interacción entre agentes patógenos, sus hospederos y las distintas condiciones ambientales que permiten el desencadenamiento de problemas sanitarios (Hedrick, 1998; World Bank Group, 2014).

Sin lugar a duda, la vigilancia epidemiológica es la herramienta más útil de la que dispone el personal sanitario para conocer, y por tanto poder controlar, las situaciones de riesgo que afectan a las poblaciones ícticas. Se trata de recoger información continua y dinámica acerca del estado de salud o enfermedad en una población animal y durante un periodo de tiempo determinado, así como de los factores relacionados con ella. En aquellos casos en que se detecta un proceso patológico, la vigilancia epidemiológica desencadena la aplicación de medidas de acción frente a dicho proceso y permite evaluar la eficacia de éstas (Bartley et al., 2006; Peeler y Taylor, 2011; Oidtmann et al., 2013; FAO, 2018).

La puesta en marcha de un programa de vigilancia epidemiológica implica la necesidad inicial de seleccionar las enfermedades o infecciones a incluir en dicho programa. Una vez seleccionadas las enfermedades se definirá la población a la cual se le aplicará el programa, el área o zona de estudio y si se realizará de forma transversal (en un momento del tiempo) o longitudinal (a lo largo de un periodo del mismo). A partir de ese momento debe plantearse la obtención de información acerca de las enfermedades y de los factores que pueden estar implicados en la presentación de las mismas. Para ello, se recurrirá a las encuestas epidemiológicas que identifican los factores asociados. Una vez identificados esos factores, se definirá su papel en la presentación de los procesos patológicos, para lo que se aplicarán los estudios observacionales (Ortega y Muzquiz, 2002; Bartley et al., 2006; Oidtmann et al., 2013).

2.5. Aproximación histopatológica al diagnóstico y manejo de la salud acuática

La identificación de una parte de la población íctica que presenta una enfermedad infecciosa de forma clínica no significa que sean sólo esos los animales que la sufren, de seguro debe existir otra parte muy importante de la población que está infectada pero no manifiesta la enfermedad clínica en el momento en que se está valorando, o incluso en muchos casos, no llegará a ser observable en ningún momento, pero en cambio, sí que será fuente del agente para los animales sanos. Eso explica que las enfermedades infecciosas en acuicultura y en otras poblaciones, entre las que se incluye la humana, sigan un modelo de “iceberg” en el que la parte de la población que sufre una infección inaparente es tan importante o incluso más que aquella parte que manifiesta la enfermedad y, por tanto, la actuación no sólo se deberá limitar a estos segundos, sino que también deberá incluir a los primeros (Ortega y Muzquiz, 2002).

Las técnicas diagnósticas usadas incluyen desde las observaciones macroscópicas hasta herramientas basadas en técnicas moleculares. El cribado o "screening" de un patógeno es otra técnica de manejo sanitario que se enfoca en la detección de patógenos en hospederos subclínicos o aparentemente sanos. Comparado al diagnóstico de enfermedad, el cribado/vigilancia requiere herramientas de detección con la suficiente sensibilidad para detectar infecciones en portadores subclínicos y/o tamaños de muestra relativamente grandes (OIE, 2000; Subasinghe et al., 2001).

Teniendo en cuenta que la enfermedad es un proceso dinámico, su estudio debe incluir la determinación de las causas (etiología), los mecanismos de enfermedad (patogénesis), los cambios estructurales inducidos en los tejidos y las células (lesiones anatomo-patológicas), la manifestación evidente de enfermedad (signos y síntomas), el mismo diagnóstico tanto clínico como patológico para el cual se utilizan diferentes herramientas en acuicultura como la necropsia, la bacteriología, virología, parasitología, histopatología, inmunohistoquímica y técnicas avanzadas de biología molecular.

Específicamente, la histopatología utiliza tejidos fijados, cortados y teñidos de tal forma que puedan ser examinados con un microscopio. Esto hace posible ver alteraciones en las células que indican una enfermedad de origen bacteriano, viral, parasitario o de otro tipo. Por tanto, la histología es la técnica más completa posible dado que es la única que en conjunto con la observación clínica puede definir a ciencia cierta si un individuo está enfermo o no; también puede la histología, en muchas ocasiones, demostrar o sugerir la presencia del agente causante de enfermedad que muchas veces no se limita solo a agentes infecciosos. En acuicultura las enfermedades rara vez son unicasales, la mayoría de las veces convergen varias etiologías, y solo la histología puede detectar las combinaciones de factores que están presentes en un brote de enfermedad, y lo más significativo, todo a partir de una pequeña muestra. Estas son algunas de las razones por las cuales el estudio microscópico de los tejidos de los animales es una herramienta invaluable para hacer una aproximación integral al análisis y control de las patologías.

Con todo, la histología tiene un lado débil: su alto grado de subjetividad. A diferencia de otras técnicas, la "subjetividad" implícita en el proceso de análisis de un tejido y la dificultad para tener métodos "objetivos" de interpretación que permitan establecer estándares sobre los cuales emitir conceptos más precisos y compatibles por distintos evaluadores en diferentes tiempos y lugares, ha obligado al desarrollo de estrategias de evaluación semicuantitativas, que en parte reduzcan la imprecisión y la "excesiva" subjetividad. Lamentablemente no son muchos los trabajos que en ictiopatología diagnóstica han abordado esta problemática de estandarización. Nowak y Lukas (1997), con fines predictivos de sanidad, determinaron con alguna sistematicidad los cambios morfológicos en branquias de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en procesos productivos. La técnica de biopsia comparada con la de necropsia resultó en una subestimación de la prevalencia de lesiones, así como del número de lesiones por

filamento, de tal suerte que la primera no podría remplazar a la segunda (Nowak y Lukas, 1997). Diversos trabajos de investigación están ahora incorporando metodologías prácticas de valoración de riesgos basadas en lesiones histopatológicas usadas como biomarcadores especialmente en estudios de contaminación ambiental. Los análisis histopatológicos ya han sido probados y propuestos como una herramienta eficiente, efectiva y sensible para el monitoreo de la salud de los peces y de contaminación ambiental en cuerpos de aguas naturales (Teh et al., 1997; Handy et al., 2002; Wester et al., 2002; Stentiford et al., 2003).

El número creciente de estudios sobre biomarcadores histopatológicos está ligado a la noción de que ellos reflejan la salud de los peces de una manera más real que los marcadores bioquímicos y pueden así ser mejor extrapolados los efectos tóxicos a nivel de comunidad y ecosistema (Au, 2004). Las clásicas aproximaciones histopatológicas esencialmente cualitativas proveen información vital sobre la descripción de lesiones histológicas y alteraciones en organismos acuáticos colectados en campo (Baumann, 1985; Köhler, 1990). A pesar de esto, la ausencia de datos numéricos dificulta el establecimiento de relaciones causa-efecto entre patología y patrones de contaminación y valorar la significancia de las diferencias entre grupos. Por tal razón, las investigaciones habituales sobre características histopatológicas de animales expuestos a contaminantes se enfocan ahora sobre índices histopatológicos para proveer datos numéricos basados en aproximaciones semicuantitativas.

Algunas de estas aproximaciones emplean exitosamente estadística multivariada usando índices de frecuencias de lesiones para comparar sitios contaminados en estudios de biomonitoreo (Del Valls et al., 1998; Riba et al., 2004; 2005). Otros autores han demostrado la utilidad de gradaciones de índices semicuantitativos basados en la progresión de lesiones en varios órganos de peces, con la ventaja de proveer índices individuales (Schwaiger, 2001; Van Dyk et al., 2007; Zimmerli et al., 2007; Triebkorn et al., 2008; Van Dyk et al., 2009; Corbett et al., 2015).

Una dificultad importante de los estudios histopatológicos en peces es la ausencia de especificidad de algunas lesiones y alteraciones hacia un agente etiológico, lo que en gran medida dificulta la valoración de la relación causa-efecto cuando están implicados múltiples agentes. Por otro lado, las alteraciones tisulares están mejor descritas en biomedicina humana y en animales domésticos que en ictiología y además existen numerosas discrepancias en la terminología y la identificación de lesiones. En un intento para resolver esta deficiencia, se desarrollan investigaciones para proveer guías sobre las claves histopatológicas de exposición a xenobióticos (Koehler, 2004). Otro punto clave bajo desarrollo se relaciona con la significancia biológica de las lesiones analizadas.

Algunos autores proponen que los índices de condición deben considerar la importancia relativa de las lesiones dado que algunas alteraciones pueden implicar mayor daño a un órgano que a otro. Se han desarrollado índices ajustados con el fin de llenar este vacío

atribuyendo un valor graduado en ordinales para una lesión específica de acuerdo con su impacto en el pez (factores de importancia) (Bernet et al., 1999).

Dado que no había un método estandarizado para describir y valorar las lesiones histológicas en peces de agua dulce, una comparación entre las observaciones en el mismo órgano no era posible. Además, una comparación cuantitativa entre varios órganos no se podía hacer porque muchos cambios no son considerados alteraciones órgano-específicas y así, no son aplicables de manera general. Bernet et al. (1999) describieron una herramienta de valoración que es aplicable a cualquier órgano, lleva a una cuantificación estandarizada, permite la posibilidad de legitimar comparaciones entre diferentes estudios, y con restricciones, también entre órganos diferentes. Esta herramienta debe llevar a un mejor entendimiento del significado de los resultados histológicos después de la exposición a un contaminante. Otros autores han hecho ligeras modificaciones a la herramienta de Bernet et al. (1999) intentando explicar el impacto medioambiental sobre los animales acuáticos (Zimmerli et al., 2007; Van Dyk et al., 2009; Raskovic et al., 2013; Corbett et al., 2015; Saraiva et al., 2015).

Aunque la histopatología es una ciencia descriptiva y la valoración de las lesiones siempre dependerá de la experiencia e interpretación del investigador, la herramienta de Bernet et al. (1999) permite comparaciones más confiables entre diferentes estudios. Una ventaja posterior de categorizar las lesiones histopatológicas es la posibilidad de valorar qué órganos han sido dañados y en qué extensión. Este es un importante prerrequisito para proyectos de vigilancia y monitoreo. Sin embargo, debe considerarse que la categorización de los resultados patológicos resulta en una simplificación, particularmente porque el uso del método debe ser aplicable a diferentes órganos. Así, los parámetros de descripción de las lesiones son esenciales a la hora de establecer índices que puedan luego ser analizados estadísticamente. Otros parámetros de descripción individual se pueden añadir al método de valoración que, aunque no sean considerados para los cálculos de índices, permiten evaluaciones adicionales más detalladas de acuerdo con las necesidades específicas de un investigador (Bernet et al., 1999). Los índices correspondientes pueden ser comparados más fácilmente que las meras descripciones morfológicas de los cambios.

3 Objetivos

La medicina animal y humana, como se deduce de la actual pandemia que afecta a todo el planeta, se basa cada vez más en el uso de técnicas moleculares sofisticadas (PCR) capaces de detectar el más mínimo indicio de la presencia de un microorganismo en un paciente, tal como la recuperación de fragmentos ínfimos de su material genético bien sea DNA o RNA; sin embargo, esta práctica ha recibido las más severas críticas en el contexto de la pandemia mundial puesto que no se tiene la certeza del significado de sus hallazgos, por ejemplo, si se trata solo de la presencia del RNA del coronavirus, si en verdad el virus está presente o no en cada paciente, la existencia de falsos positivos o falsos negativos, etc. Varias voces autorizadas han llamado la atención sobre el olvido de los principios epistemológicos en que se fundamenta la medicina desde tiempos inmemoriales: el enfermo y no la etiología o causa es el elemento central del fenómeno enfermedad; la etiología es apenas un pequeño factor dentro del concepto amplio enfermo-enfermedad.

La propuesta que aquí se presenta se basa precisamente en el reconocimiento de este desenfoco epistemológico: en los sistemas de producción animal de lo que se trata es de determinar la existencia o ausencia de una enfermedad a través de los enfermos, no la simple presencia de un microorganismo o de su material genético. Para “fortuna” de la salud de una población de peces en una granja, con una muestra pequeña representativa rutinaria de los individuos se puede ejercer la práctica de la medicina, es decir examinar a los enfermos y en consecuencia establecer el estatus de la enfermedad en dicha granja, pero lo que es más importante, de manera indirecta determinar el estado de salud de toda la población. Para ello en este trabajo se emplea la técnica de la histopatología, la cual, como se demuestra en el mismo, permite mediante el análisis cualitativo y numérico de las lesiones de una entidad específica: la estreptococosis por *Streptococcus agalactiae*, determinar cuándo un pez está sano y cuando con las mismas lesiones, pero en distinta proporción indican que está enfermo.

Nuestra hipótesis es que las tilapias en condiciones de cultivo presentan una cierta cantidad de lesiones en distintos órganos que son específicas de estreptococosis por *S. agalactiae*, pero que no son suficientes para que un pez o una población manifiesten enfermedad clínica; se parte de hallazgos previos de miembros de nuestro grupo de investigación que demostraron la alta especificidad y sensibilidad de la técnica de la histopatología en el diagnóstico de esta enfermedad (Hernández et al., 2009). Como estrategia epistemológica se aprovecha el concepto epidemiológico de enfermedad subclínica, que nosotros mejor definimos como lesiones subclínicas, como indicador

precoz de la presentación de formas clínicas. Como corolario de la anterior hipótesis se sostiene que para que se exprese la enfermedad clínica en los individuos y en la población debe existir una cierta calidad y cantidad de lesiones características de estreptococosis. Aún más, el apropiado manejo de toda la anterior información histológica junto con otra información proveniente de las granjas permite el diseño de un sistema predictivo de la enfermedad y sienta las bases para desarrollos similares de otras entidades que afectan a las tilapias.

3.1. Objetivo general

Desarrollar modelos basados en lesiones histológicas que permitan el diagnóstico y la predicción de estreptococosis por *S. agalactiae* en tilapias.

3.2 Objetivos específicos

Complementariamente se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Definir las lesiones histopatológicas típicas que permitan diagnosticar estreptococosis por *S. agalactiae* con suficiente sensibilidad y especificidad en tilapias sanas y con signos de enfermedad.
2. Estimar la frecuencia de las lesiones histológicas relevantes para el diagnóstico de estreptococosis.
3. Desarrollar modelos histopatológicos para diagnóstico de estreptococosis.
4. Validar la eficiencia y utilidad de los modelos diagnósticos y de predicción de la entidad.

4 Metodología

4.1. Diseño del estudio

4.1.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio epidemiológico observacional transversal que utiliza muestras obtenidas de un programa de vigilancia epidemiológica en granjas de producción de tilapias del departamento de Huila (Colombia).

4.1.2. Selección de la muestra para evaluación

Para calcular el tamaño de la muestra se utilizó un índice de frecuencia de alteraciones histopatológicas esperado del 35% (Rey et al., 2014), un error experimental del 5% y un nivel de confianza del 95% según la fórmula planteada por diversos autores (Martin et al., 1987):

$$n = Z^2 \cdot \frac{P \cdot (1-P)}{E^2}$$

donde:

n: Tamaño de la muestra necesario

Z: 1.96 para un nivel de confianza del 95%

P: Frecuencia de lesiones esperada

E: Error aceptado

La anterior fórmula determinó un tamaño mínimo de muestra igual a 350 peces.

4.1.3. Origen de la población estudiada

Las tilapias incluidas en este trabajo formaron parte de un estudio epidemiológico más amplio donde se obtuvieron 5 292 individuos a partir de cuatro granjas de producción comercial en el departamento del Huila (Colombia). Estos peces se colectaron entre los años 2008 y 2010 cada 30 días durante tres ciclos de producción de aproximadamente 7 meses cada uno (21 meses aproximadamente) cumpliendo con la Ley 84 de 1989 Estatuto Nacional de Protección de Animales, Capítulo V: Del sacrificio de los animales, artículo 17, literal j.: Con fines experimentales, investigativos o científicos y Capítulo VI: Del uso de animales vivos en experimentos e investigación, Artículos 23 y 24 y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud: Título V: La investigación biomédica con animales, artículos 87 y 88.

El mencionado estudio incluyó peces desde la fase de alevinos (< 20 g) hasta engorde (> 400 g); además, se consideró el tipo de muestreo: 1) Aleatorio: peces sin signos

clínicos de enfermedad alguna y 2) Dirigido: peces con cualquier signo clínico de enfermedad (nado errático o en círculos, “boqueo”, erosiones en piel o aletas, ascitis y/o exoftalmia).

Las tilapias incluidas en el presente estudio fueron escogidas al azar a partir de la muestra mayor como se dijo, de tal manera que se incluyeran al menos 3 peces colectados en cada visita mensual a cada granja, sin conocer el origen del tipo de muestreo (aleatorio o dirigido). En la Tabla 5 se muestra la distribución de la población finalmente utilizada en el presente estudio.

Tabla 5. Distribución poblacional de las tilapias analizadas en el presente estudio

Granja	Número de tilapias examinadas		
	Total	Muestreo aleatorio	Muestreo dirigido
1	79	62	17
2	86	63	25
3	94	63	34
4	95	59	31
Total	354	247	107

4.2. Procesamiento de las muestras

4.2.1. Evaluación clínica bajo anestesia

Los animales se anestesiaron en una solución de metasulfonato de triclaína (MS222® Sigma-Aldrich) (50 mg/l) y se les practicó la eutanasia por medio de un corte espinal inmediatamente caudal al cráneo y al margen superior de los opérculos, de acuerdo con los protocolos de eutanasia que se aprobaron posteriormente en 2013 (AVMA, 2013). Enseguida se examinó la condición general y cualquier alteración macroscópica externa y/o interna (según protocolos del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia).

4.2.2. Procesamiento para bacteriología

En cada visita, a partir de cada uno de los peces, se tomaron muestras con asa estéril a partir de riñón e hígado para ser sembradas en agar BHI con sangre de ovino e incubados a 28°C durante al menos 48 h. Los crecimientos bacteriológicos fueron procesados en laboratorio para su identificación bioquímica (según protocolos del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia).

4.2.3. Procesamiento para histopatología

En el caso de animales muy pequeños solo se abrió la cavidad abdominal y se depositaron de inmediato en formalina tamponada a pH 6.9. Cuando los peces eran suficientemente grandes se tomaron las muestras para microbiología de acuerdo con el punto anterior e inmediatamente se tomaron los tejidos para histopatología. De cada

uno de los individuos se tomaron ojo, branquia, cerebro, corazón, hígado, bazo, riñón, estómago e intestino incluyendo grasa visceral. Las muestras fueron procesadas por la técnica de rutina para hematoxilina-eosina (Luna, 1968), según el protocolo del Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de Colombia, para identificar lesiones compatibles con enfermedades de cualquier origen.

4.3. Definición de lesiones histológicas en tilapia

4.3.1. Listado de lesiones

En este estudio todas las lesiones se evalúan por la técnica microscópica es decir por histopatología. También se debe aclarar que las siguientes expresiones se emplearan como sinónimos: lesión, alteración, daño, hallazgo o cambio. Los órganos y tejidos fueron evaluados en su totalidad para una revisión sistemática de las alteraciones microscópicas según los patrones de reacción sugeridos por Bernet et al. (1999), con algunas modificaciones como se observa en las Tablas 6 a 9. La piel y la cavidad oral también fueron evaluadas cuando estaban presentes.

Los disturbios circulatorios (Tabla 6) están relacionados con alteraciones en la condición de la sangre o del flujo de ésta y se observan en casi todos los órganos afectados por alguna patología. Por ejemplo, en el corazón la congestión y el edema se ubican con predilección en el epicardio dada la localización de los vasos sanguíneos, mientras que los microtrombos suelen observarse en el peritoneo/páncreas y no en el hepatopáncreas. Los aneurismas sólo se observan en las branquias.

Tabla 6. Lesiones correspondientes a disturbios circulatorios observadas en distintos órganos de acuerdo con los patrones de reacción propuestos por Bernet et al. (1999)

Órgano o tejido	Congestión	Edema	Hemorragia	Microtrombos	Aneurismas
Branquias	X	X	X	X	X
Ojo	X	X	X	X	
Meninges	X	X	X	X	
Cerebro	X	X	X	X	
Riñón - Nefrona	X		X		
Riñón - Intersticio	X	X	X	X	
Corazón	En epicardio	En epicardio	X	X	
Mucosa gastrointestinal		X			
Submucosa gastrointestinal	X	X	X	X	
Muscular gastrointestinal	X		X		
Hígado	X	X	X	X	
Hepatopáncreas y peritoneo/páncreas	X	X	X	En peritoneo/páncreas	
Bazo	X	X	X	X	
Gónada	X	X	X		

Tabla 7. Lesiones por cambios regresivos observadas en distintos órganos según los patrones de reacción de Bernet et al. (1999)

Órgano o tejido	Alteraciones arquitecturales y estructurales	Pigmentos / depósitos	Degeneración vacuolar /Otras degeneraciones	Detritus/ materia orgánica en la luz	Necrosis/ muerte celular
Branquias	Atrofia de lamelas		En cartilago	X	Pérdida de lamelas. Pérdida /necrosis de filamentos
Ojo			Lente		X
Meninges					X
Cerebro			Cromatolisis central y periférica. Degeneración vacuolar		X
Riñón - Nefrona		Nefrocalcinosis	Gotas hialinas		Epitelio tubular Linfocitos
Riñón - Intersticio					Leucocitos
Corazón					X
Mucosa gastrointestinal	Arquitectura alterada de los pliegues intestinales (atrofia, fusión, malformaciones, etc.)		Vacuolización epitelial Gotas hialinas en enterocitos	X	Necrosis glandular estomago
Submucosa gastrointestinal					X
Muscular gastrointestinal		Mineralización	Bandas hialinas (bandas de hipercontracción)		X
Hígado		Ceroide /lipofuscina en hepatocitos	Degeneración vacuolar anatómica. Gotas hialinas en hepatocitos. Degeneración hialina. Degeneración hidrópica. Degeneración vacuolar lipóidea (micro y macrovesicular). Degeneración plumosa		X
Hepatopáncreas y peritoneo/páncreas			Degeneración lipóidea		X
Bazo	Depleción de linfocitos		Degeneración de eritrocitos		X
Gónada					X

Los cambios regresivos (Tabla 7) son aquellos que causan la reducción funcional o pérdida del órgano. Algunos suelen verse como una alteración en la arquitectura y estructura del órgano como la atrofia de las lamelas branquiales, cambios en los pliegues intestinales o depleción de linfocitos en el bazo; los depósitos de pigmentos son más frecuentes en riñón, bazo e hígado. Los detritus celulares en las branquias y la luz gastrointestinal se consideran consecuencia de procesos necróticos en estas superficies. Los procesos degenerativos y necróticos con frecuencia acompañan diferentes patologías en los peces.

Los cambios progresivos (Tabla 8) son procesos que conllevan a una mayor actividad en las células o tejidos en respuesta a algún estímulo o patología. Además de las hiperplasias e hipertrofias propuestas por Bernet et al. (1999), se incluye la mayor actividad de las células de moco en especial en branquiespinas y filamentos branquiales, así como en la mucosa gastrointestinal; también se toma en cuenta la mayor actividad de los centros melanomacrófagos (CMM) con preferencia en órganos parenquimatosos como riñón, hígado, bazo, páncreas y ocasionalmente en las branquias.

Tabla 8. Lesiones correspondientes a cambios progresivos observadas en distintos órganos de acuerdo con los patrones de reacción propuestos por Bernet et al. (1999)

Órgano o tejido	Activación de células de moco	Activación centros melanomacrófagos	Hiperplasia	Hipertrofia
Branquias	En branquiespinas y filamentos	X	Células de cloro en tejido interlamelar	
Ojo				
Meninges				
Cerebro			Gliosis	
Riñón - Nefrona			Nefroneogénesis	
Riñón - Intersticio		X		
Corazón				Endocardio
Mucosa gastrointestinal	X		X	
Submucosa gastrointestinal				
Muscular gastrointestinal				
Hígado		X	Hiperplasia hepatocitos Hiperplasia canalículos biliares Células gigantes Células binucleadas	
Hepatopáncreas y peritoneo/páncreas		X		
Bazo		X	Hiperplasia linfocitos	Elipsoides

Los procesos inflamatorios (Tabla 9), de acuerdo con Bernet et al. (1999), muchas veces se asocian a otros patrones como a los disturbios circulatorios o cambios progresivos hiperplásicos. Las células inflamatorias involucradas por lo general son mononucleares (MN): macrófagos y linfocitos (en tilapia de manera exclusiva, puesto que hasta la fecha

no hemos identificado células que con certeza se puedan considerar neutrófilos en esta especie), estas infiltran los tejidos o forman granulomas, estos últimos relacionados con patologías crónicas. También se reporta proliferación de mastocitos o células granulares eosinofílicas asociadas a los procesos inflamatorios; en tilapia, según nuestra experiencia, son muy comunes en distintos procesos patológicos.

Tabla 9. Lesiones correspondientes a inflamación observadas en distintos órganos de acuerdo con los patrones de reacción propuestos por Bernet et al. (1999)

Órgano o tejido	Infiltración de macrófagos, linfocitos	Hiperplasia y migración linfocitos	Proliferación y activación de mastocitos	Granulomas
Branquias	Branquitis Arcobranquitis Operculitis Branquiespinitis	Hiperplasia epitelial con infiltrado linfocítico	Branquiespina	X
Ojo	Endoftalmitis Exoftalmitis Panofthalmitis Retinitis Coroiditis		X	X
Meninges	Meningitis		X	X
Cerebro	Encefalitis Ventriculitis		X	X
Riñón - Nefrona	X	Migración		
Riñón - Intersticio	Intersticial nefritis	Migración	X	X
Corazón	Endocarditis Miocarditis Epicarditis		En epicardio	X
Mucosa gastrointestinal	X			
Submucosa gastrointestinal	X		X	X
Muscular gastrointestinal	X		X	X
Hígado	Hepatitis		X	X
Hepatopáncreas y peritoneo/páncreas	Hepatopancreatitis Pancreatitis peritoneal Peritonitis		X	X
Bazo	Esplenitis	Hiperplasia linfoidea (estímulo antigénico)		X
Gónada	Orquitis Ovaritis		X	X

Las neoplasias o tumores en tilapias cultivadas son poco frecuentes, quizás debido al corto tiempo del cultivo y las condiciones controladas del confinamiento. Sin embargo, hemos diagnosticado linfoma en mucosa y submucosa intestinal, hígado, hepatopáncreas, peritoneo/páncreas y bazo.

En adición a las lesiones y alteraciones incluidas en esta investigación, se tuvo en cuenta la presencia de agentes patógenos como bacterias cocoides o bacilares, así como parásitos y hongos en todos los tejidos evaluados.

4.3.2. Valoración de severidad y extensión

Para la valoración de la intensidad de las diferentes lesiones y alteraciones morfológicas en los tejidos se usaron dos variables categóricas: Severidad (grado de daño, agresividad con que se manifiesta una lesión) y Extensión (área de tejido involucrado en una lesión) con la gradación que se explica en la Tabla 10.

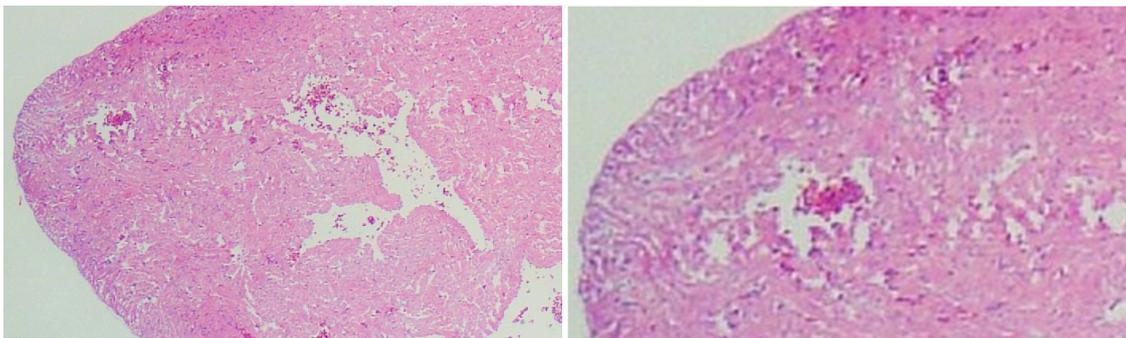
Tabla 10. Grado de severidad y extensión de las lesiones (Grupo de investigación en Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia)

Grado	Severidad	Extensión
0	Ausencia de lesión	Ausencia de lesión
1	Leve (células y arquitectura de la lesión con actividad baja, visibles con alguna dificultad con objetivo 4x)	Presencia focal (1-33%)
2	Moderada (células y arquitectura de la lesión con actividad media fácilmente evidente desde el objetivo 4x)	Multifocal (34-66%)
3	Severa (células y arquitectura de la lesión con actividad alta, el tejido normal se identifica con dificultad)	Generalizada (>66%)

En la Figura 13 se muestra un ejemplo aplicado de la Tabla 10, donde se observa la ausencia de lesión en epicardio codificado como 0 (A); epicarditis leve focal codificada como 1.1 (B); epicarditis moderada multifocal codificada como 2.2 (C) y epicarditis severa generalizada codificada como 3.3 (D).

Figura 13. Categorización de severidad y extensión en epicarditis (izquierda: 4x, derecha: 10x)

A. Epicardio sano: 0 (Ausencia de lesión)



B. Epicarditis leve focal: 1.1 (Nótese la escasa infiltración de MN en la superficie del epicardio)

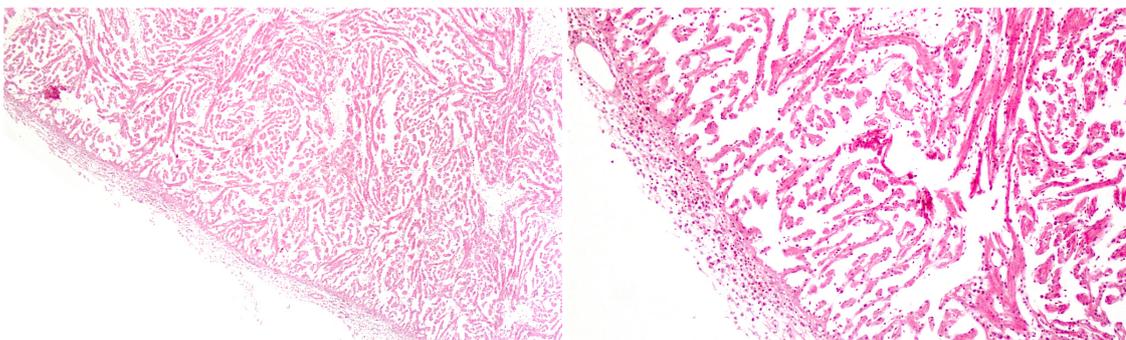
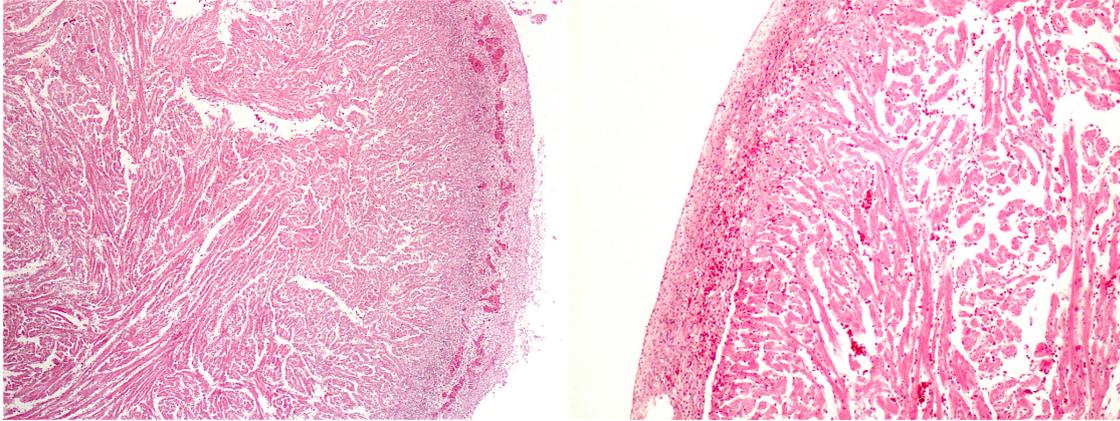
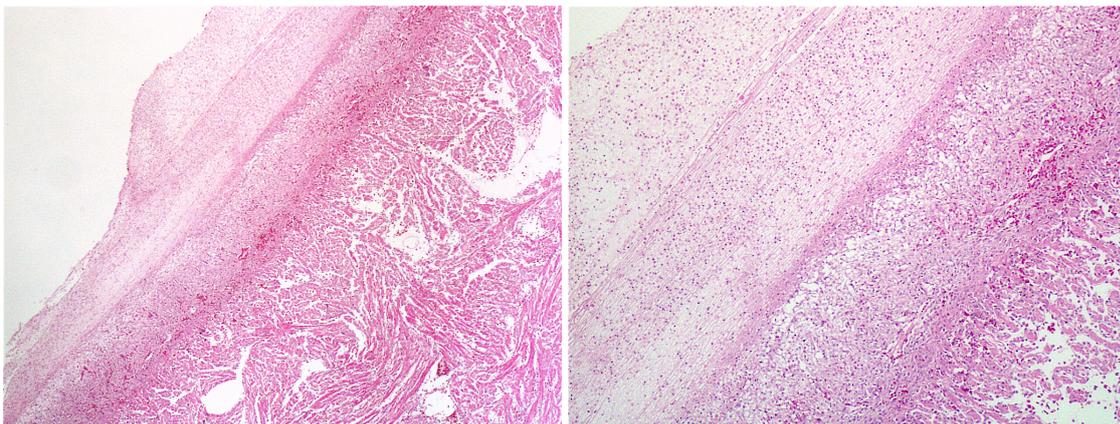


Figura 13 (cont). Categorización de severidad y extensión en epicarditis (izquierda: 4x, derecha: 10x).

C. Epicarditis moderada multifocal: 2.2 (El epicardio se hace un poco más grueso, hay moderada congestión e infiltración de MN)



D. Epicarditis severa generalizada: 3.3 (Nótese el grave engrosamiento de la membrana epicárdica, con remanentes de congestión en la región más interna contigua al miocardio y el enorme número de MN a lo largo y ancho de la membrana)



4.3.3. Determinación de diagnósticos positivos a estreptococosis por *S. agalactiae* ST 260

Para el diagnóstico positivo a estreptococosis por *S. agalactiae* ST 260 se tomaron aquellas lesiones compatibles con la entidad reportadas por diferentes autores: meningoencefalitis y epicarditis necróticas hemorrágicas y/o granulomatosas, el ojo (coroides, esclerótica y globo ocular) con hemorragias hasta procesos fibrinosos y granulomatosos y la presencia misma de la bacteria; así como lesiones del mismo carácter que se pueden encontrar en otros órganos, pero que son mucho menos frecuentes (Pulido et al., 2004; Chen et al., 2007; Hernández et al., 2009).

Adicional a las lesiones compatibles con estreptococosis se recopilieron otras alteraciones presentes en los órganos y tejidos relacionadas con diferentes entidades patológicas de la tilapia (Rey et al., 2002).

4.3.4 Organización y tabulación de las calificaciones y el diagnóstico

Para organizar y tabular las calificaciones otorgadas para cada lesión se creó una base de datos Microsoft Access. En ella se almacenó la calificación de severidad y extensión de cada una de las lesiones microscópicas presentes en cada uno de los peces evaluados organizados por órganos y sistemas tal y como se observa en la Figura 14: sistema respiratorio y cardiocirculatorio, estómago, intestino, anexos digestivos (hígado y páncreas) y peritoneo, sistema nervioso (encéfalo y meninges) y ojo, riñón, gónadas y otros. El objetivo fue sistematizar la colecta de todas las lesiones microscópicas que se pudieron identificar en cada una de las tilapias seleccionadas para formar parte del estudio. El diagnóstico final de los evaluadores, con base en las diferentes lesiones registradas, se introdujo en la hoja que se muestra en la Figura 15.

Figura 14. Formulario de Microsoft Access para la introducción de las calificaciones de severidad y extensión de cada pez identificado por número de placa histológica

Lesiones Microscópicas (Alba) Id. Lámina: 3969 : 1 (12/05/2008) - Nº pez: 214

Sist. Circulatorio | Estómago | Intestino | Anexos Digestivos y Peritoneo | Sist Nervioso | Riñón, Gónadas y otros

Branquias		Cocos		Corazón		Bazo	
Activación céls. calciformes	2,2	Cocos	0	Endocarditis	1,2	Activación de CMM	3,3
Arcobranquitis/Branquiespinitis	0	Coco-bacilos	0	Epicarditis	3,3	Degeneración glóbulos rojos	0
Atrofia y/o pérdida de lamelas	2,1	Bacilos	0	Granulomas	3,2	Depleción	1,2
Degeneración del cartilago	0	Bact. filamentosas	0	Necrosis	1,2	Esplenitis	0
Desprendimiento filamentosos	0	Epitheliocystis	1	Hipertrofia del endocardio	0	Granulomas	3,3
Detritus celulares en la luz	1,1	Ichthyophthirius	0	Miocarditis	0	Muerte de leucocitos	0
Granulomas	0	Microsporidium	0	Piogranulomas	0	Necrosis	0
Hemorragias	0	Mixosporidios	0	Cocos	0	Piogranulomas	0
Hiperplasia céls. moco branquiespinas	1,2	Piscinoodinium	0	Coco-bacilos	0	Cocos	0
Hiperplasia interlamelar	3,1	Trematodos digeneos	0	Bacilos	0	Coco-bacilos	0
Materia orgánica en la luz	1,1	Trematodos monogeneos	1	Bact. filamentosas	0	Bacilos	0
Necrosis	2,1	Trichodinas-Chilodonellas	0			Bact. filamentosas	0
Inflamación	2,1						

Lesiones Microscópicas (Alba) Id. Lámina: 3969 : 1 (12/05/2008) - Nº pez: 214

Sist. Circulatorio | Estómago | Intestino | Anexos Digestivos y Peritoneo | Sist Nervioso | Riñón, Gónadas y otros

Estómago		Lámina propia		Submucosa		Muscular	
Mucosa		Inflamación	0	Granulomas	0	Degeneración	0
Alteraciones glandulares	0	Muerte celular	0	Inflamación	0	Inflamación	0
Detritus celulares luz	0	Necrosis	0	Muerte celular	0	Granulomas	0
Granuloma	0	Cocos	0	Necrosis	0	Muerte celular	0
Inflamación	0	Coco-bacilos	0	Piogranulomas	0	Necrosis	0
Muerte celular	0	Bacilos	0	Cocos	0	Cocos	0
Necrosis	0	Bact. filamentosas	0	Coco-bacilos	0	Coco-bacilos	0
Ulceraciones	0	Parásitos	0	Bacilos	0	Bacilos	0
Cocos	0			Bact. filamentosas	0	Bact. filamentosas	0
Coco-bacilos	0			Parásitos	0	Parásitos	0
Bacilos	0						
Bact. filamentosas	0						
Parásitos	0						

Figura 14 (continuación). Formulario de Microsoft Access para la introducción de las calificaciones de severidad y extensión de cada pez identificado por número de placa histológica

Lesiones Microscópicas (Alba) Id. Lámina: 3969 : 1 (12/05/2008) - N° pez: 214

Sist. Circulatorio Estómago **Intestino** Anexos Digestivos y Peritoneo Sist Nervioso Riñón, Gónadas y otros

Intestino

Mucosa	Lámina propia	Submucosa	Muscular
Activación céls. caliciformes: 0	Inflamación: 0	Granulomas: 0	Degeneración: 0
Alteración arquitectura pliegues: 0	Muerte celular: 0	Inflamación: 2,2	Inflamación: 0
Alteraciones glandulares: 0	Necrosis: 0	Muerte celular: 0	Granuloma: 0
Detritus celulares luz: 0	Cocos: 0	Necrosis: 0	Muerte celular: 0
Granuloma: 0	Coco-bacilos: 0	Piogranulomas: 0	Necrosis: 0
Inflamación: 0	Bacilos: 0	Cocos: 0	Cocos: 0
Liberación de moco en la luz: 0	Bact. filamentosas: 0	Coco-bacilos: 0	Coco-bacilos: 0
Mat. eosinofílico (proteína) en luz: 0	Parásitos: 0	Bacilos: 0	Bacilos: 0
Migración leucocitos: 1,1		Bact. filamentosas: 0	Bact. filamentosas: 0
Muerte celular: 0		Parásitos: 0	Parásitos: 0
Necrosis: 0			
Ulceraciones: 0			

Lesiones Microscópicas (Alba) Id. Lámina: 3969 : 1 (12/05/2008) - N° pez: 214

Sist. Circulatorio Estómago Intestino **Anexos Digestivos y Peritoneo** Sist Nervioso Riñón, Gónadas y otros

Hígado

Activación de CMM: 0	Cocos: 0
Alteraciones nucleares: 0	Coco-bacilos: 0
Cont. Granular Eosinófilo Hepatocitos: 0	Bacilos: 0
Degeneración Vacuolar Patológica: 2,3	Bact. filamentosas: 0
Granulomas: 0	Parásitos: 0
Hemorragia: 0	
Inflamación: 1,1	
Muerte celular: 0	
Necrosis: 0	
Pigmentos intracelulares: 0	
Piogranulomas: 0	

Hepatopáncrea:

Activación CMM: 1,1
Granulomas: 0
Hemorragias: 0
Inflamación: 0
Necrosis: 0

Peritoneo / Páncreas

Activación CMM: 0
Granulomas: 0
Hemorragias: 0
Inflamación: 0
Necrosis: 0
Piogranulomas: 0
Cocos: 0
Coco-bacilos: 0
Bacilos: 0
Bact. filamentosas: 0
Parásitos: 0

Lesiones Microscópicas (Alba) Id. Lámina: 3969 : 1 (12/05/2008) - N° pez: 214

Sist. Circulatorio Estómago Intestino Anexos Digestivos y Peritoneo **Sist Nervioso** Riñón, Gónadas y otros

Encéfalo

Encefalitis: 0
Granulomas: 0
Necrosis: 0
Piogranulomas: 0
Ventriculitis: 3,1
Cocos: 0
Coco-bacilos: 0
Bacilos: 0
Bact. filamentosas: 0
Parásitos: 0

Meninges

Granulomas: 3,2
Inflamación: 3,3
Necrosis: 2,2
Piogranulomas: 0
Cocos: 2
Coco-bacilos: 0
Bacilos: 0
Bact. filamentosas: 0
Parásitos: 0

Ojo

Coroiditis: 0
Endoftalmitis: 0
Exoftalmitis: 0
Necrosis: 3,2
Granulomas: 3,2
Panoftalmitis: 3,3
Piogranulomas: 0
Cocos: 1
Coco-bacilos: 0
Bacilos: 0
Bact. filamentosas: 0
Parásitos: 0

Figura 14 (continuación). Formulario de Microsoft Access para la introducción de las calificaciones de severidad y extensión de cada pez identificado por número de placa histológica

Lesiones Microscópicas (Alba) Id. Lámina: 3969 : 1 (12/05/2008) - Nº pez: 214

Sist. Circulatorio Estómago Intestino Anexos Digestivos y Peritoneo Sist Nervioso Riñón, Gónadas y otros

Riñón

Glomérulos

Inflamación 0

Tejido intersticial

Activación de CMM 2,1

Granulomas 2,2

Hemorragias 0

Nefritis 2,2

Piogranulomas 0

Cocos 0

Coco-bacilos 0

Bacilos 0

Bact. filamentosas 0

Parásitos 0

Túbulos

Deg. vacuolar patológica 0

Granulomas 0

Material proteináceo 0

Muerte tubular 0

Necrosis tubular 0

Nefrocalcinosis 0

Paso de Leucocitos 0

Piogranulomas 0

Cocos 0

Coco-bacilos 0

Bacilos 0

Bact. filamentosas 0

Parásitos 0

Otras observaciones microscópicas

1.1 necrosis intersticial

Figura 15. Formulario de Microsoft Access para la introducción de los diagnósticos etiológicos de acuerdo con las lesiones histológicas compatibles, según con el criterio del evaluador

Diagnóstico Alba

Id. Lámina 1143

Identificador del muestreo 2 - 12/05/2008

Nº pez 421

Estreptococosis Positivo

Edwardsielosis Negativo

Aeromoniasis Negativo

Origen nutricional Positivo

Calidad de agua Negativo

Parasitismo branquial Positivo

4.4. Análisis de la información

Para el análisis estadístico, los datos fueron exportados desde Microsoft Access a IBM SPSS 19.0 para Windows. El error alfa fue establecido en 0.05.

4.4.1. Fase 1: Concordancia de las evaluaciones histopatológicas y del diagnóstico final de estreptococosis

Para determinar la fiabilidad de las valoraciones histopatológicas se confrontó la consistencia de la observación de cada lesión por la estudiante con la observación de un experto (tutor) para medir el grado de acuerdo entre los dos. Este grado de acuerdo se midió mediante el coeficiente de concordancia Kappa de Cohen, el cual relaciona la

coincidencia que exhiben los observadores, más allá del debido al azar, con la coincidencia máximo posible descontado el azar. Adicionalmente, se comprobó la concordancia en el diagnóstico final de estreptococosis entre ambos evaluadores basado en las lesiones observadas y mencionadas en el apartado 4.3.3.

La concordancia se evaluó utilizando dos posibles enfoques, en primer lugar, considerando la severidad y la extensión de cada lesión como variables dicotómicas (ausencia/presencia), lo que denominamos en los resultados como concordancia dicotómica, y en el caso de la concordancia entre severidad y extensión analizadas como variables categóricas se realizó un ajuste cuadrático para dar mayor peso a las discordancias extremas, y en ese caso la denominamos concordancia cuadrática.

Para este análisis inicial se tomó al azar una muestra adicional de 35 tilapias (el 10% del total de peces colectados para el estudio), tanto sanas (n=12) como enfermas (n=23) las cuales fueron sometidas al mismo procedimiento y sistema de calificación ya mencionados.

Una vez obtenidas las calificaciones y diagnósticos de la estudiante y del tutor se calcularon los coeficientes de concordancia Kappa y su significación estadística, y los resultados se interpretaron de acuerdo con la escala propuesta por Landis y Koch (1977), la cual considera como *aceptable* un valor entre 0.40 y 0.60, *adecuado* entre 0.60 y 0.80 y *excelentes*, los valores superiores a 0.80.

4.4.2. Fase 2: Caracterización de lesiones y su asociación con diagnóstico de estreptococosis causada por *S. agalactiae* ST 260

4.4.2.1. Estimación de las frecuencias de las lesiones estratificadas según tipo de muestreo y diagnóstico de estreptococosis

A partir de las lesiones observadas en todos los peces incluidos en el estudio se estimó la frecuencia de las diferentes lesiones y patógenos globalmente y clasificados según el tipo de muestreo (aleatorio o dirigido) y según el diagnóstico positivo o negativo a estreptococosis. Las alteraciones se clasificaron como muy frecuentes (>50%), frecuentes (25-50%), moderadamente frecuentes (10-25%), poco frecuentes (5-10%) y muy poco frecuentes (0.1-5%).

Además, se evaluó la asociación entre el diagnóstico de estreptococosis y el tipo de muestreo. Para ello se analizaron las correspondientes tablas de contingencia 2x2 mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson, o la prueba exacta de Fisher si había alguna celda con valores esperados menores de 5 (De Muth, 2014).

4.4.2.2. Correlación entre las calificaciones para grado y extensión de las lesiones y asociación con el tipo de muestreo

Se evaluó la correlación entre la severidad y la extensión de las lesiones que tuvieron

una frecuencia de presentación por encima del 5%. Al tratarse de variables categóricas ordinales se utilizó la prueba d de Somers cuya interpretación se muestra en la Tabla 11, de manera que cuando el resultado es estadísticamente significativo ($p < 0.05$), un coeficiente próximo a 1 indica que el grado de severidad y de extensión van a presentar valores muy similares (es decir, lesiones leves de extensión focal o lesiones severas que son generalizadas), valores próximos a 0 indican ausencia de correlación entre severidad y extensión, y valores próximos a -1 indicarían que cuando el grado de severidad es alto, el grado de extensión va a ser bajo y viceversa (es decir, lesiones leves con distribución generalizada o lesiones severas de extensión focal) (De Muth, 2014).

Tabla 11. Clasificación del coeficiente d de Somers en valor absoluto

Correlación	d de Somers
Muy alta	0.8-1
Alta	0.6-0.8
Moderada	0.4-0.6
Baja	0.2-0.4
Muy baja	<0.2

Adicionalmente, se estableció si había relación del grado de severidad o de la extensión con respecto al tipo de muestreo, es decir si las calificaciones se comportan similar en un muestreo aleatorio como en un muestreo dirigido. Para eso se analizaron las correspondientes tablas de contingencia con la prueba de Chi cuadrado de Pearson, y como alternativa en caso de hallarse más del 20% de casillas con frecuencias esperadas inferiores a 5 se utilizó la prueba de razones de verosimilitud.

4.4.2.3. Determinación de las lesiones correlacionadas con el diagnóstico de estreptococosis

Mediante la prueba d de Somers también se estableció si el diagnóstico de estreptococosis es dependiente del grado de la severidad o la extensión de las lesiones, estudiado de forma estratificada tanto para el muestreo aleatorio como el muestreo dirigido.

4.4.3. Fase 3: Desarrollo de modelos histopatológicos para diagnóstico de estreptococosis causada por *S. agalactiae* ST 260

4.4.3.1. Construcción de modelos

Para la construcción de modelos diagnósticos predictivos de estreptococosis se utilizó la prueba de regresión logística con el método “hacia adelante condicional”, la cual permite conservar las variables independientes (lesiones) que aportan al diagnóstico positivo de estreptococosis (variable dependiente) o prescindir de las que no, debido a su redundancia. La significación de modelo se estimó mediante la prueba ómnibus y el coeficiente de determinación (R^2) de Nagelkerke.

Se generaron cuatro modelos según la asociación de la severidad y la extensión de una lesión con el tipo de muestreo y la correlación de severidad y extensión con el diagnóstico de estreptococosis calculada de forma global y estratificada para cada tipo de muestreo.

El primer modelo, que denominaremos modelo general simple, utiliza sólo aquellas lesiones cuyas calificaciones de severidad y extensión son independientes del tipo de muestreo. La selección de la severidad o la extensión de la lesión como variable independiente del modelo se realizó en función de su mayor correlación global con el diagnóstico de enfermedad, es decir, la que presentó una mayor d de Somers.

Los otros tres modelos utilizan lesiones en las que las calificaciones de severidad y extensión estaban significativamente asociadas con el tipo de muestreo, y se calcularon los coeficientes de correlación d de Somers estratificados según el tipo de muestreo.

En función de ello generamos un segundo modelo, denominado modelo general avanzado, que incluyó las lesiones cuyas calificaciones de severidad y/o extensión estaba significativamente correlacionadas con el diagnóstico de enfermedad tanto en el muestreo aleatorio como en el dirigido.

El modelo aleatorio incluyó las lesiones cuya severidad y/o extensión estuvieron correlacionadas con el diagnóstico para las muestras aleatorias, y se seleccionó la calificación que tuviera un mayor coeficiente d de Somers.

Y finalmente el modelo dirigido, de forma similar al anterior, incluyó las lesiones en las que la severidad y/o la extensión se correlacionaron significativamente con el diagnóstico en las muestras procedentes de un muestreo dirigido, y de igual modo se seleccionó severidad o extensión según la que presentó una mayor correlación con el diagnóstico de enfermedad.

Además de las lesiones se incluyó la presencia de agentes etiológicos clasificados según su morfología que estuvieron significativamente asociados con el diagnóstico positivo a la estreptococosis.

4.4.3.2. Evaluación de la fiabilidad diagnóstica de los modelos

Para evaluar la fiabilidad diagnóstica de los modelos generados en el punto anterior, se determinaron la sensibilidad y la especificidad mediante el análisis del área bajo la curva ROC (*Receiver Operator Characteristics*). Se definió el punto de corte óptimo para cada modelo predictivo para maximizar la J de Youden definida como la suma de la sensibilidad y la especificidad menos 1.

Los intervalos de confianza de sensibilidad y especificidad se calcularon utilizando el método Score de Wilson (Wilson, 1927).

A pesar de que los resultados de la regresión logística corresponden a una escala

continua entre 0 y 1, debido a que se trabajó con variables categóricas el número de resultados posibles corresponde realmente a una variable discreta, es decir, con un número determinado de valores. En consecuencia, es posible que la predicción para un individuo coincida con el valor del punto de corte. Por ese motivo se plantean dos tipos de interpretaciones: una interpretación sensible que considera como positivos a todos los valores iguales o superiores a punto de corte (y negativos a los menores al punto de corte), y una interpretación específica donde se clasifica como positivos a los resultados con valores superiores al punto de corte, y negativos a los que presentan un valor igual o menor a dicho punto de corte.

4.4.3.3. Validación de los modelos diagnósticos

Para validar los modelos se tomó una muestra adicional de 100 tilapias seleccionadas al azar del estudio global, en el cual participaron otros evaluadores además de la investigadora de este estudio y el referente, y se estimó el resultado diagnóstico pronosticado de acuerdo con las lesiones seleccionadas según lo descrito en el apartado 4.4.3.1 y los puntos de corte determinados en el apartado 4.4.3.2, se implementaron los modelos de regresión logística mediante formularios en Microsoft Excel.

A continuación, se comparó el diagnóstico obtenido según los modelos con el establecido por los expertos y se calcularon la sensibilidad y especificidad de cada uno de los modelos, tanto con la interpretación sensible como específica antes descrita.

La comparación de los resultados de sensibilidad y especificidad inicialmente estimados al generar modelos con los obtenidos en el proceso de validación se realizó comparando el solapamiento de los intervalos de confianza.

5

Resultados y discusión

5.1. Diagnósticos positivos a estreptococosis por *S. agalactiae* ST 260

El diagnóstico de lesiones debidas a *S. agalactiae* y de estreptococosis, de acuerdo con las lesiones histológicas compatibles con la enfermedad mencionadas en el apartado 4.3.3 del capítulo anterior, arrojó una frecuencia de 35.6% en tilapias obtenidas en el muestreo aleatorio y de 69.2% en las del muestreo dirigido. La frecuencia total de diagnósticos positivos a la enfermedad, basada en las lesiones, fue 45.8% (n=162). Es de resaltar el preocupante aumento en la frecuencia de las lesiones en animales sin signos clínicos (muestras aleatorias) y en aquellos con signos de la enfermedad (estreptococosis) en el presente estudio comparado con estudios previos en Colombia, cuando se reportaron entre 7.9 y 14.3% a partir de muestreos aleatorios y 29.8% a partir de muestreos dirigidos (Jiménez et al., 2007; 2007a; Hernández et al., 2009; Rey et al., 2014), es decir, incrementos mayores al 100%. Este hecho amerita de por sí, investigar las razones de tales incrementos, así como las implicaciones sanitarias y económicas que pueda tener la entidad en las poblaciones de tilapia en Colombia y seguramente en el mundo.

Los resultados de los análisis microbiológicos correspondientes a la muestra de 354 peces analizados en el presente estudio arrojaron un 2.33% (n=9) de crecimientos bacterianos, y de éstos, únicamente el 1.03% (n=4) resultaron positivos a *S. agalactiae* ST 260. Como se indicó en la metodología, estos aislamientos se obtuvieron a partir de hígado y riñón, y fueron confirmados por pruebas microbiológicas; se trata de cocos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativos, que forman colonias no hemolíticas y por medio de la reacción en cadena de la polimerasa se determinó que se trataba de la cepa ST260 (Iregui et al., 2014; Barato et al., 2015).

El número de aislamientos de *S. agalactiae* en esta investigación fue muy bajo, debe recordarse, sin embargo, que el estudio epidemiológico más amplio, del cual se tomaron las muestras de este trabajo, no estaba dirigido única y exclusivamente a la determinación de este patógeno, sino a un amplio rango de etiologías; probablemente se deban estos resultados al hecho de que se emplearon medios de cultivo de rutina de amplio espectro; además, las muestras se tomaron del riñón y del hígado que, como se sabe, no son los principales órganos de replicación de este agente tal como lo demostraron Hernández et al. (2009) quienes obtuvieron una mayor probabilidad de aislamiento a partir de bazo y cerebro.

Se debe señalar, como lo demostraron Hernández et al. (2009), que la sensibilidad y la especificidad de la prueba de microbiología para *S. agalactiae* fue por lo menos cuatro

veces menor frente a la histopatología, y en su estudio obtuvieron unas prevalencias aparentes de 7% y 29% para cada técnica, respectivamente. Estas muestras fueron tomadas a partir de un muestreo dirigido de tilapias de diferentes grupos etarios. En otros estudios de nuestro grupo de investigación, se han encontrado resultados similares y se constata la baja frecuencia de aislamientos bacteriológicos aun a partir de órganos con mayor frecuencia de lesiones por el patógeno como el cerebro, ojo y bazo, con frecuencias de aislamientos entre 1.2 y 5.2% a partir de muestreos aleatorios (Jiménez et al., 2007; 2007a; Rey et al., 2014). Resultados parecidos son reportados por otros investigadores y sugieren que las técnicas de cultivo microbiológico genéricas parecen inadecuadas para detectar posibles portadores asintomáticos de *S. agalactiae* (Shoemaker et al., 2001); es decir, que las bacterias podrían estar presentes en los tejidos pero no disponibles (al encontrarse dentro de macrófagos) o en número insuficiente para ser detectadas por las técnicas bacteriológicas de rutina, al menos en los órganos muestreados en el presente estudio.

5.2. Fase 1: Concordancia y repetibilidad de la valoración de las lesiones observadas en el estudio

5.2.1. Concordancia de la calificación de las lesiones

Se determinó que los estimadores más adecuados para la interpretación de la concordancia entre evaluadores fueron el coeficiente Kappa de Cohen calculado considerando las lesiones tanto como dicotómicas (hay o no hay lesión) y el coeficiente Kappa con ponderación cuadrática, el cual considera la concordancia entre las diferentes calificaciones de 0 a 3 para la severidad y extensión de las lesiones y penaliza más las discrepancias grandes que las pequeñas. Recordemos que, según Landis y Koch (1977), se considera como aceptable un valor entre 0.40 y 0.60, adecuado entre 0.60 y 0.80, y excelentes los valores superiores a 0.80 para cualquiera de los dos métodos para calcular Kappa.

De las 169 lesiones listadas en el punto 4.3.1 de la metodología, 105 estuvieron presentes en la muestra de 35 peces utilizados para evaluar la concordancia entre la investigadora y el referente, estas se evaluaron teniendo en cuenta su grado de severidad y extensión; se encontró además la presencia de 28 patógenos entre bacterias y parásitos. Finalmente, solo se pudo calcular la concordancia entre evaluadores para 77 lesiones y 17 agentes etiológicos, ya que es necesario que los dos evaluadores reconozcan la misma lesión o el patógeno al menos una vez en una misma muestra, de lo contrario no es posible calcular el coeficiente (Tablas 12 y 13 y Anexo 1).

Como se deduce de la Tabla 12, la concordancia entre evaluadores al considerar las lesiones como dicotómicas no fue aceptable en el 46.8% de las muestras ($Kappa < 0.4$), lo que se puede explicar en parte a la frecuencia de las lesiones observadas. De acuerdo

con Thompson y Walters (1988), uno de los factores que afecta al valor de Kappa calculada para variables dicotómicas (presencia/ausencia) es la frecuencia de las observaciones (en este caso de las lesiones), hay una tendencia a disminuir el valor del coeficiente cuando la frecuencia es muy alta o muy baja, debido a la eliminación de la influencia del azar. Con frecuencias intermedias, los valores de Kappa tenderán a ser más altos debido a la distribución de las variables. Esto es considerado un defecto del coeficiente, por tanto, se deben interpretar con cuidado los valores de Kappa particularmente los resultados de las concordancias entre dos observadores, al comparar variables o lesiones con frecuencias extremas (próximas a 0 o 100%).

Por otra parte, la gran mayoría de lesiones que obtuvieron concordancias no aceptables (27 de 36) se localizan en branquias, hígado, riñón, estómago e intestino que se pueden ver afectados por cambios inespecíficos muchas veces asociados a la calidad ambiental y que pueden ser sobre o subdiagnosticados, de acuerdo con Wolf et al. (2015).

Tabla 12. Resumen de la concordancia entre evaluadores para la presencia de lesiones, su severidad y extensión (número de lesiones en cada categoría y porcentaje entre paréntesis)

Rango de Kappa	Frecuencia de lesiones	Grado de severidad	Grado de extensión
Excelente: >0.8-1.0	14 (18.2%)	20 (26.0%)	14 (18.2%)
Adecuado: 0.6-0.8	10 (13.0%)	14 (18.2%)	13 (16.9%)
Aceptable: 0.4-0.6	17 (22.1%)	15 (19.5%)	16 (20.8%)
No aceptable: <0.4	36 (46.8%)	28 (36.4%)	34 (44.2%)

Las calificaciones de grado de severidad tuvieron mucho mejor concordancia al considerarlas como una variable categórica (ausencia, leve, moderado y severo) y calcular el coeficiente Kappa utilizando una ponderación cuadrática, de forma que un 63.6% (n=49) de las lesiones analizadas presentaron una concordancia aceptable, adecuado o excelente, lo que mejoró los resultados de concordancia frente a los observados en los análisis dicotómicos, donde solo un 53.2% (n=41) presentaron coeficientes Kappa superiores a 0.4. Un comportamiento similar, aunque en menor medida, mostraron las concordancias de las calificaciones de extensión de las lesiones al usar la ponderación cuadrática la cual fue de 55.8% (n=43). Lo anterior indica que hubo buenas concordancias en general y especialmente al considerar las calificaciones de 0 a 3, correspondientes al grado de severidad y la extensión, otorgadas por cada observador. Las concordancias detalladas por órganos y lesiones se pueden observar en el Anexo 1A.

De acuerdo con Vet (2014), en el caso de los coeficientes de Kappa calculados mediante la ponderación cuadrática, y que se usaron en este estudio para la calificación de los criterios severidad y extensión, se considera que las concordancias son más difíciles de clasificar correctamente, esperándose valores más bajos por lo general. Sin embargo, las concordancias entre los evaluadores en este trabajo, expuestas en los Anexos 1A y 1B, demuestran ser aun mejores frente a las dicotómicas. Por tanto, nuestros resultados

validan la repetibilidad del método de evaluación histológica utilizado en el presente estudio, así como la categorización de las calificaciones de 0 a 3, es decir que es un sistema de calificación válido que puede ser reproducible por otros observadores.

La limitación de concordancia sobre la presencia o ausencia de patógenos (Tabla 13) fue sensiblemente mejor, con sólo un 5.9% de patógenos que mostraron una concordancia no aceptable. El registro de agentes etiológicos por parte de los observadores tuvo mejores concordancias al realizar el análisis dicotómico (presencia/ ausencia) (94.1% de patógenos con Kappa > 0.4) comparadas con los valores calculados mediante ponderación cuadrática (88.2%). Aunque en ambas evaluaciones las concordancias fueron muy buenas como se puede comprobar en el Anexo 1B.

Tabla 13. Resumen de la concordancia entre evaluadores para la presencia de patógenos y su grado de infección (número de patógenos en cada categoría y porcentaje entre paréntesis)

Rango de Kappa	Presencia del patógeno	Grado de severidad
Excelente: >0.8	3 (17.6%)	6 (35.3%)
Adecuado: 0.6-0.8	11 (64.7%)	8 (47.1%)
Aceptable: 0.4-0.6	2 (11.8%)	1 (5.9%)
No aceptable: <0.4	1 (5.9%)	2 (11.8%)

De acuerdo con Gibson-Corley et al. (2013), la calificación de las lesiones tisulares es una herramienta útil para evaluar los tejidos en el caso de investigaciones, pero también para corroborar los hallazgos morfológicos de los diagnósticos. La repetibilidad en los métodos diagnósticos de patología (incluida la calificación o gradación de las lesiones tisulares) es una consideración relevante e importante en el diseño experimental, así como en el registro de datos en casos de vigilancia epidemiológica.

5.2.2. Concordancia diagnóstica de estreptococosis

Para el diagnóstico de la enfermedad (estreptococosis) en este trabajo se evaluó la concordancia entre los dos evaluadores (tutor y estudiante) obteniéndose una Kappa significativa igual a 0.729 ($p < 0.001$), que de acuerdo con la escala de Landis y Koch (1977) se considera francamente buena y adecuada.

Para emitir el diagnóstico positivo a estreptococosis por *S. agalactiae* ST 260, los evaluadores tomaron como referencia aquellas lesiones compatibles con la entidad reportadas por diferentes autores en corazón (epicarditis), sistema nervioso (meningitis) e inflamaciones en ojo (coroides, esclerótica y globo ocular) con características desde necrótico hemorrágicas hasta granulomatosas y la presencia misma de la bacteria (Eldar et al., 1995; Pulido et al., 2004; Chen et al., 2007; Filho et al., 2009; Hernández, 2009; Delamare-Deboutteville et al., 2015; Ortega et al., 2016; Su et al., 2017). La gran mayoría de estos hallazgos tuvieron coeficientes de concordancias mayores de 0.4 tanto en las

ponderaciones dicotómicas como en las cuadráticas. Lo anterior nos proporciona certeza que los resultados obtenidos a partir de las observaciones de la estudiante son consistentes.

5.3. Fase 2: Caracterización de las lesiones y su asociación con diagnóstico de estreptococosis

5.3.1. Asociación de la frecuencia de las lesiones con el tipo de muestreo

Teniendo en cuenta los tipos de lesiones y los órganos analizados se identificó un total de 104 lesiones, que se clasificaron como: muy frecuentes (n=19, Tabla 14), frecuentes (n=14, Tabla 15), moderadamente frecuentes (n=24, Tabla 16), poco frecuentes (n=12, Tabla 17) y muy poco frecuentes (n=35, Tabla 18).

En cada tabla las lesiones se muestran ordenadas por frecuencia total decreciente, se desglosan las frecuencias de cada lesión según el tipo de muestreo aleatorio o dirigido y si existen diferencias significativas entre ellos.

En general, las lesiones fueron más frecuentes en los tejidos obtenidos de muestreos dirigidos que en los aleatorios y con diferencias significativas ($p < 0.05$) especialmente en las lesiones con frecuencias mayores de 5%.

La mayoría de las lesiones muy frecuentes (por encima del 50%) en esta investigación tienen lugar en las mucosas respiratoria y gastrointestinal y presentan una frecuencia elevada en peces procedentes de ambos tipos de muestreo (Tabla 14). Son lesiones relacionadas con la mayor exposición de estos tejidos (con mayor tasa metabólica) a un ambiente acuático muchas veces de baja calidad (abundantes sólidos en suspensión, bajas concentraciones de oxígeno, entre otras características) y a la presencia de parásitos en estos órganos (van Dyk et al., 2009; Wolf et al., 2015; Steckert et al., 2018).

Se observaron diferencias significativas en la mayoría de las lesiones según el tipo de muestreo; en general, en el muestreo dirigido la frecuencia de lesiones fue mayor que en el aleatorio. Sin embargo, en algunas de las alteraciones branquiales más frecuentes como hiperplasia interlamelar branquial, branquitis, detritus celulares en la luz branquial y atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales, esta asociación se invirtió y fueron más habituales en los muestreos aleatorios, lo que indicaría que se trata de lesiones inespecíficas en las branquias (posiblemente debidas a mala calidad del agua) que comprometerían la supervivencia de los peces frente a otras patologías.

De acuerdo con diversos autores, estos resultados histológicos deben considerarse señales de alarma en respuesta a la exposición a condiciones ambientales deficientes de diversa índole, entre las que se incluyen la presencia de parásitos (Triebkorn et al., 2008; van Dyk et al., 2009; Steckert et al., 2018). No obstante, expertos en patología de peces

consideran que varias de estas lesiones, incluidas algunas en hígado y riñón, pueden estar sobrediagnosticadas debido a errores en la evaluación calificándolas incorrectamente como anormales; estos autores consideran que las causas más frecuentes de este error es la fijación inadecuada, deficiente calidad de la lámina histológica y la falta de experiencia del evaluador (Wolf et al., 2015); en consecuencia, especial cuidado debe darse a la interpretación de estos hallazgos no solamente en tilapias sino en otras especies de peces.

Tabla 14. Lesiones muy frecuentes (>50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Lesión	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Branquias	Hiperplasia interlamelar branquial	91.8	93.9	86.9	0.027 ^{X2}
Branquias	Branquitis	87.3	88.3	85.0	0.405 ^{X2}
Riñón	Nefritis intersticial perivascular	84.5	81.4	91.6	0.015 ^{X2}
Bazo	Activación de CMM en bazo	82.2	79.8	87.8	0.067 ^{X2}
Branquias	Detritus celulares en la luz branquial	78.2	81.8	70.1	0.014 ^{X2}
Intestino	Migración de leucocitos en mucosa intestinal	73.7	74.1	72.9	0.815 ^{X2}
Intestino	Activación células caliciformes en mucosa intestinal	73.2	69.2	82.2	0.011 ^{X2}
Branquias	Activación células caliciformes en branquias	72.6	71.7	74.8	0.547 ^{X2}
Estómago	Inflamación en submucosa gástrica	71.2	67.6	79.4	0.024 ^{X2}
Estómago	Necrosis/muerte en epitelio de mucosa gástrica	68.6	64.4	78.5	0.008 ^{X2}
Estómago	Inflamación en mucosa gástrica	64.7	61.1	72.9	0.033 ^{X2}
Branquias	Necrosis en branquias	62.4	60.3	67.3	0.214 ^{X2}
Intestino	Inflamación en submucosa intestinal	62.1	56.3	75.7	0.001 ^{X2}
Branquias	Atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales	58.8	65.2	43.9	<0.001 ^{X2}
Bazo	Depleción linfocitos en bazo	55.6	50.6	67.3	0.004 ^{X2}
Riñón	Activación de CMM en intersticio renal	55.1	54.7	56.1	0.805 ^{X2}
Hígado	Hepatitis	51.7	44.9	67.3	<0.001 ^{X2}
Branquias	Hiperplasia células caliciformes en branquiespinas	54.0	53.8	54.2	0.950 ^{X2}
Ojo	Coroiditis	50.3	46.2	59.8	0.018 ^{X2}

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Dentro de las lesiones frecuentes (Tabla 15) la frecuencia fue menor en el muestreo aleatorio (tilapias asintomáticas) que en el muestreo dirigido (tilapias sintomáticas), las diferencias más marcadas se presentaron en la meningitis (23.1% vs 63.6%, respectivamente) y la epicarditis (27.5% vs 64.5%, respectivamente) que son lesiones reconocidas como muy compatibles con estreptococosis (Pulido et al., 2004; Zamri-Saad et al., 2010; Alsaïd et al., 2013).

Sin embargo, se observaron otras diferencias significativas muy notables en las frecuencias de otras lesiones no reportadas habitualmente como típicas de la estreptococosis, incluso con una frecuencia dos veces superior en tilapias procedentes de un muestreo dirigido que en las de un muestreo aleatorio, entre estas destacamos la

degeneración vacuolar en hepatocitos (23.9% vs 60.7%), la hepatopancreatitis (28.3% vs 64.5%), la necrosis intersticial renal (27.1% vs 62.6%) y la necrosis/muerte en mucosa intestinal (31.2% vs 62.6%).

Tabla 15. Lesiones frecuentes (25-50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Lesión	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Riñón	Degeneración vacuolar en túbulos renales	44.6	39.7	56.1	0.004 ^{X2}
Intestino	Detritus celulares en la luz intestinal	43.5	45.3	39.3	0.288 ^{X2}
Bazo	Esplenitis	40.7	32.8	58.9	<0.001 ^{X2}
Intestino	Necrosis/muerte en mucosa intestinal	40.7	31.2	62.6	<0.001 ^{X2}
Riñón	Necrosis/muerte de túbulos renales	39.5	36.8	45.8	0.114 ^{X2}
HP	Hepatopancreatitis	39.3	28.3	64.5	<0.001 ^{X2}
Corazón	Epicarditis	38.7	27.5	64.5	<0.001 ^{X2}
Riñón	Necrosis intersticial renal	37.9	27.1	62.6	<0.001 ^{X2}
Riñón	Paso de leucocitos en túbulos renales	37.0	38.1	34.6	0.534 ^{X2}
Sist. nerv.	Meningitis	35.3	23.1	63.6	<0.001 ^{X2}
Hígado	Degeneración vacuolar en hepatocitos	35.0	23.9	60.7	<0.001 ^{X2}
Branquias	Arcobranquitis/branquiespinitis	32.8	34.4	29.0	0.317 ^{X2}
Intestino	Liberación de moco en la luz intestinal	28.5	28.3	29.0	0.904 ^{X2}
Corazón	Endocarditis	28.2	28.3	28.0	0.954 ^{X2}

HP: Hepatopáncreas

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Las lesiones con frecuencia moderada (10-25%) (Tabla 16) como ventriculitis, encefalitis, granulomas en corazón y ojo, y necrosis en corazón, meninges, ojo y encéfalo así como lesiones poco frecuentes (5-10%) (Tabla 17) como miocarditis, exoftalmatitis y granulomas en meninges, forman parte también de las lesiones reportadas en la literatura como asociadas a la estreptococosis por *S. agalactiae* (Chen et al., 2007; Filho et al., 2009; Su et al., 2017) y en el presente estudio se hallaron con una frecuencia significativamente muy superior en los peces procedentes de muestreos dirigidos en los que se detectaron tilapias con esta enfermedad.

Otras lesiones de estos últimos grupos, que tuvieron diferencias significativas en las frecuencias entre muestreos y que no son consideradas típicas de estreptococosis, son alteraciones de tipo necrótico, inflamatorio o degenerativas en hígado, bazo, riñón, páncreas y tracto gastrointestinal. Estas lesiones al igual que aquellas muy frecuentes con características similares, probablemente estarían asociadas a otras patologías bien sea infecciosas (aeromoniasis y edwardsielosis, entre otras), nutricionales o de otro origen reportadas por diferentes autores y nuestro grupo en Colombia (Rey et al., 2002; Rey et al., 2009; Huicab-Pech et al., 2016; Iregui et al., 2019; Vaz Rodrigues et al., 2019).

Como sucedió con las lesiones muy frecuentes se demostraron asociaciones significativas con una mayor frecuencia de presentación en peces procedentes del muestreo aleatorio que en el dirigido, lo que indicaría que ese tipo de cambios podrían tener un valor pronóstico negativo para los peces sintomáticos, y por ello son más difíciles de encontrar en este grupo de animales. Entre estos destacamos cambios en el tracto digestivo como la presencia de detritus celulares en la luz gástrica (25.9% vs 15.9%), acúmulo de material eosinofílico (proteína) en la luz intestinal (7.7% vs 1.9%), alteraciones glandulares en la mucosa gástrica (7.3% vs 1.9%), y en las branquias con un mayor desprendimiento de filamentos branquiales (9.7% vs 0.9%). Estas alteraciones pueden ser debidas a mala calidad del agua, a las características del alimento administrado y/o a la presencia de otros agentes bacterianos distintos a *S. agalactiae*.

Tabla 16. Lesiones con frecuencia moderada (10-25% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Lesión	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Corazón	Necrosis en corazón	24.6	11.3	55.1	<0.001 ^{X2}
Sist. nerv.	Necrosis en meninges	23.7	11.7	51.4	<0.001 ^{X2}
Riñón	Gotas hialinas en túbulos renales	23.2	14.6	43.0	<0.001 ^{X2}
Estómago	Detritus celulares en la luz gástrica	22.9	25.9	15.9	0.039 ^{X2}
HP	Activación de CMM en hepatopáncreas	22.6	15.8	38.3	<0.001 ^{X2}
Bazo	Necrosis en bazo	22.6	9.7	52.3	<0.001 ^{X2}
Ojo	Necrosis en ojo	22.0	11.7	45.8	<0.001 ^{X2}
Intestino	Inflamación en mucosa intestinal	20.6	16.2	30.8	0.002 ^{X2}
Riñón	Granulomas en intersticio renal	20.1	17.4	26.2	0.059 ^{X2}
Hígado	Necrosis/muerte en hígado	16.7	12.1	27.1	0.001 ^{X2}
Estómago	Necrosis/muerte en submucosa gástrica	15.8	8.9	31.8	<0.001 ^{X2}
Sist. nerv.	Ventriculitis	15.8	8.9	31.8	<0.001 ^{X2}
Bazo	Degeneración eritrocitos en bazo	15.5	14.6	17.8	0.448 ^{X2}
HP	Necrosis en hepatopáncreas	15.3	6.5	35.5	<0.001 ^{X2}
Intestino	Alteración arquitectura pliegues intestinales	13.8	15.0	11.2	0.346 ^{X2}
P/P	Peritonitis/ Pancreatitis peritoneal	13.0	8.5	23.4	<0.001 ^{X2}
Hígado	Activación de CMM en hígado	13.0	10.9	17.8	0.079 ^{X2}
Sist. nerv.	Necrosis en encéfalo	13.0	5.3	30.8	<0.001 ^{X2}
Bazo	Granulomas en bazo	12.7	10.9	16.8	0.126 ^{X2}
Corazón	Granulomas en corazón	12.7	10.1	18.7	0.026 ^{X2}
Ojo	Granulomas en ojo	11.6	7.7	20.6	0.001 ^{X2}
Intestino	Necrosis/muerte en submucosa intestinal	10.5	4.0	25.2	<0.001 ^{X2}
Sist. nerv.	Encefalitis	10.5	3.2	27.1	<0.001 ^{X2}
Corazón	Hipertrofia del endocardio	10.5	10.1	11.2	0.757 ^{X2}

HP: Hepatopáncreas; P/P: Peritoneo/páncreas

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Tabla 17. Lesiones poco frecuentes (5-10% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Lesión	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Bazo	Muerte de leucocitos en bazo	8.8	6.5	14.0	0.021 ^{X2}
Branquias	Hemorragias en branquias	8.5	8.1	9.3	0.698 ^{X2}
Corazón	Miocarditis	8.5	2.8	21.5	<0.001 ^{X2}
Ojo	Exoftalmítis	8.5	2.4	22.4	<0.001 ^{X2}
Branquias	Desprendimiento filamentos branquiales	7.1	9.7	0.9	0.003 ^{X2}
Sist. nerv.	Granulomas en meninges	6.8	4.5	12.1	0.008 ^{X2}
Intestino	Degeneración hialina en muscular intestinal	6.5	0.4	20.6	<0.001 ^{X2}
Hígado	Gotas hialinas en hepatocitos	6.5	3.2	14.0	<0.001 ^{X2}
Intestino	Material eosinofílico (proteína) en la luz intestinal	5.9	7.7	1.9	0.033 ^{X2}
P/P	Necrosis en peritoneo/páncreas	5.6	1.6	15.0	<0.001 ^{X2}
Branquias	Degeneración del cartílago branquial	5.6	6.5	3.7	0.305 ^{X2}
Estómago	Alteraciones glandulares en mucosa gástrica	5.6	7.3	1.9	0.043 ^{X2}

P/P: Peritoneo/páncreas

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Por último, en las 35 lesiones muy poco frecuentes (<5%) (Tabla 18) solo se obtuvieron diferencias significativas según la procedencia de la muestra en cuatro lesiones, las cuales fueron menos frecuentes en peces del muestreo aleatorio que en el dirigido, estas son: inflamación en la capa muscular intestinal (1.6% vs 7.5%), necrosis/muerte en las capas musculares gástrica (0.0% vs 2.8%) e intestinal (0.0% vs 6.5%), y granulomas en branquias (1.6% vs 5.6%). Hay que destacar, no obstante, que en el caso de las lesiones necróticas en la capa muscular gástrica y en la intestinal sólo aparecieron en peces procedentes de un muestreo dirigido, aunque su frecuencia de aparición fue muy baja por lo que su valor diagnóstico para estreptococosis es limitado.

Tabla 18. Lesiones muy poco frecuentes (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Lesión	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Estómago	Inflamación muscular gástrica	4.0	3.2	5.6	0.221 ^F
Estómago	Degeneración hialina en muscular gástrica	4.0	3.2	5.6	0.221 ^F
Ojo	Endoftalmítis	3.7	2.8	5.6	0.166 ^F
Hígado	Granulomas en hígado	3.7	3.6	3.7	0.589 ^F
Intestino	Inflamación en muscular intestinal	3.4	1.6	7.5	0.009 ^F
Riñón	Nefrocalcinosis en túbulos renales	3.4	2.4	5.6	0.118 ^F
HP	Granulomas en hepatopáncreas	3.1	2.8	3.7	0.437 ^F
Estómago	Granulomas en submucosa gástrica	3.1	2.8	3.7	0.437 ^F
Riñón	Glomerulitis	3.1	2.0	5.6	0.078 ^F

Tabla 18 (cont). Lesiones muy poco frecuentes (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Lesión	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Hígado	Pigmentos intracelulares en hepatocitos	2.8	3.2	1.9	0.374 ^F
Sist. nerv.	Granulomas en encéfalo	2.8	2.8	2.8	0.645 ^F
Branquias	Granulomas en branquias	2.8	1.6	5.6	0.047 ^F
P/P	Granulomas Peritoneo/Páncreas	2.5	3.2	0.9	0.188 ^F
Intestino	Necrosis/muerte en muscular intestinal	2.0	0.0	6.5	<0.001 ^F
Hígado	Alteraciones nucleares en hepatocitos	2.0	2.4	0.9	0.322 ^F
Ojo	Panofalmitis	1.4	0.8	2.8	0.165 ^F
P/P	Activación de CMM en peritoneo/páncreas	1.4	0.8	2.8	0.165 ^F
Sist. nerv.	Granulomas con centro activo en encéfalo	1.1	1.2	0.9	0.648 ^F
Sist. nerv.	Granulomas con centro activo en meninges	1.1	1.2	0.9	0.648 ^F
Estómago	Ulceraciones en mucosa gástrica	1.1	1.2	0.9	0.648 ^F
Riñón	Hemorragias en intersticio de riñón	1.1	0.4	2.8	0.084 ^F
Estómago	Granulomas en mucosa gástrica	0.8	0.8	0.9	0.662 ^F
Estómago	Necrosis/muerte en muscular gástrica	0.8	0.0	2.8	0.027 ^F
Intestino	Granulomas en submucosa intestinal	0.8	0.8	0.9	0.662 ^F
Riñón	Granulomas con centro activo en intersticio renal	0.8	0.8	0.9	0.662 ^F
Riñón	Granulomas en túbulos renales	0.8	0.4	1.9	0.218 ^F
Corazón	Granulomas con centro activo en corazón	0.6	0.4	0.9	0.514 ^F
Hígado	Granulomas con centro activo en hígado	0.6	0.4	0.9	0.514 ^F
Intestino	Granulomas con centro activo en submucosa intestinal	0.6	0.0	1.9	0.091 ^F
Ojo	Granulomas con centro activo en ojo	0.6	0.4	0.9	0.514 ^F
P/P	Granulomas con centro activo en peritoneo/páncreas	0.3	0.0	0.9	0.302 ^F
Bazo	Granulomas con centro activo en bazo	0.3	0.0	0.9	0.302 ^F
Estómago	Granulomas en muscular gástrica	0.3	0.0	0.9	0.302 ^F
Hígado	Hemorragias en hígado	0.3	0.0	0.9	0.302 ^F
Intestino	Ulceraciones en mucosa intestinal	0.3	0.4	0.0	0.698 ^F

HP: Hepatopáncreas; P/P: Peritoneo/páncreas

F: Significación estadística según la prueba exacta de Fisher

Al analizar la relación del tipo de muestreo con la presencia de agentes etiológicos (Tablas 19 y 20), llama la atención que en la mayoría de los órganos y tejidos se demostró una mayor frecuencia de bacterias cocoides en las tilapias procedentes de los muestreos dirigidos comparadas con las obtenidas en muestreos aleatorios, se debe indicar de todas maneras, que su frecuencia fue baja de manera general y que se corresponde con la baja posibilidad de obtener cultivos positivos de la bacteria. Aunque no se debe tomar de forma taxativa, estos cocos con alta probabilidad corresponden a *S. agalactiae* ST 260 según nuestros hallazgos de inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y biología molecular

(Pulido et al., 2010; Jiménez et al., 2011; Iregui et al., 2015). Destaca la mayor presencia de los cocos en corazón, bazo, meninges, ojo, encéfalo, hígado y riñón.

Tabla 19. Agentes etiológicos observados (>5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Agente etiológico	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Branquias	Monogeneos en branquias	51.4	47.8	59.8	0.037 ^{X2}
Branquias	Materia orgánica en branquias	50.0	53.8	41.1	0.028 ^{X2}
Branquias	<i>Trichodinas-Chilodonellas</i> en branquias	45.5	41.3	55.1	0.016 ^{X2}
Branquias	<i>Epitheliocystis</i> en branquias	39.5	37.7	43.9	0.268 ^{X2}
Branquias	<i>Mixosporidios</i> en branquias	10.5	10.9	9.3	0.654 ^{X2}
Branquias	Trematodos digeneos en branquias	7.1	4.9	12.1	0.014 ^{X2}
Corazón	Bacterias cocos en corazón	7.1	1.2	20.6	<0.001 ^{X2}
Bazo	Bacterias cocoides en bazo	5.4	1.6	14.0	<0.001 ^{X2}
Branquias	Bacterias cocoides en branquias	5.1	5.3	4.7	0.816 ^{X2}
Sist. nerv.	Bacterias cocoides en meninges	5.1	2.0	12.1	<0.001 ^{X2}

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Tabla 20. Agentes etiológicos observados (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el tipo de muestreo (Ale: aleatorio y Dir: dirigido)

Órgano	Agente etiológico	Frecuencia según muestreo (%)			
		Total	Ale.	Dir.	p
Intestino	Bacterias coco-bacilos en intestino	3.1	3.2	2.8	0.563 ^F
Ojo	Bacterias cocoides en ojo	2.5	0.8	6.5	0.004 ^F
Sist. nerv.	Bacterias cocoides en encéfalo	2.3	0.8	5.6	0.011 ^F
Hígado	Bacterias cocoides en hígado	2.0	0.8	4.7	0.028 ^F
Intestino	Bacterias cocoides en intestino	1.7	1.2	2.8	0.259 ^F
Estómago	Bacterias cocoides en estómago	1.1	0.8	1.9	0.352 ^F
Intestino	Parásitos en intestino	1.1	1.2	0.9	0.648 ^F
Abdomen	Bacterias cocoides en peritoneo/páncreas	0.8	0.4	1.9	0.218 ^F
Branquias	<i>Microsporidium</i> en branquias	0.8	0.4	1.9	0.218 ^F
Intestino	Bacterias bacilos en intestino	0.8	0.8	0.9	0.662 ^F
Riñón	Bacterias cocoides en riñón	0.8	0.0	2.8	0.027 ^F
Branquias	Bacterias bacilos en branquias	0.6	0.8	0.0	0.486 ^F
Branquias	<i>Ichthyophthirius</i> en branquias	0.6	0.8	0.0	0.486 ^F
Branquias	<i>Piscinoodinium</i> en branquias	0.6	0.8	0.0	0.486 ^F
Estómago	Bacterias cocoides en submucosa de estómago	0.6	0.0	1.9	0.091 ^F
Estómago	Parásitos en estómago	0.3	0.4	0.0	0.698 ^F
Estómago	Parásitos en submucosa de estómago	0.3	0.0	0.9	0.302 ^F
Hígado	Parásitos en hígado	0.3	0.4	0.0	0.698 ^F

F: Significación estadística según la prueba exacta de Fisher

Conforme a trabajos de nuestro grupo y a nuestra propia experiencia, en este estudio se diagnosticaron con alta frecuencia otros agentes biológicos como parásitos monogéneos (51.4%), *Trichodinas-Chilodonellas* (45.5%) y quistes de bacterias como *Epitheliocystis* (39.5%), con menor frecuencia quistes de *Myxosporidios* (10.5%) y trematodos digéneos (7.1%). Al considerar el tipo de muestreo se constató una frecuencia significativamente mayor de parásitos monogéneos, digéneos, y de *Trichodinas-Chilodonellas* en tilapias procedentes del muestreo dirigido.

Por último, se apreció material extraño en las branquias del 50% de los peces analizados; en este caso la frecuencia fue significativamente superior en las tilapias seleccionadas de forma aleatoria (Tabla 19).

La mayor cantidad de parásitos branquiales junto con la materia orgánica son considerados indicadores de baja calidad del agua de los cultivos. Aunque la frecuencia de algunos parásitos puede ser alta, las lesiones por lo general son leves en tilapias de monitoreos de rutina y lesiones moderadas a severas en caso de brotes de enfermedades de cualquier otro origen (Iregui et al., 2019). La Tabla 19 es un buen ejemplo de lo antes citado: como se ve, excepto por los cocos, las poblaciones de parásitos son similares entre los dos grupos de muestreo.

5.3.2. Correlación entre severidad y extensión de las lesiones

El siguiente paso fue determinar la correlación existente entre las calificaciones para severidad y extensión de cada lesión (evaluada mediante la prueba d de Somers), y comprobar si la severidad y/o la extensión estaban asociadas con el tipo de muestreo (evaluado mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson o la prueba de razón de verosimilitud cuando la prueba Chi-cuadrada no fue válida).

En este análisis sólo se incluyeron las lesiones que tuvieron una frecuencia de presentación mayor al 5%, es decir, un total de 69 lesiones (66.3% de todas las lesiones evaluadas). Los resultados completos de este análisis para las lesiones de cada uno de los órganos o tejidos evaluados se presentan en el Anexo 2, y en las Tablas 21 a 30 incluimos un resumen de las lesiones organizadas por órganos y en orden descendente de la correlación entre severidad y extensión.

Tabla 21. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en branquias y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Degeneración del cartílago	5.6	0.993	<0.001	0.340 ^{RV}	0.082 ^{RV}
Hemorragias	8.5	0.990	<0.001	0.876 ^{RV}	0.818 ^{RV}
Desprendimiento de filamentos	7.1	0.981	<0.001	0.001 ^{RV}	0.002 ^{RV}
Arcobranquitis/branquiespinitis	32.8	0.907	<0.001	0.094 ^{RV}	0.754 ^{RV}

Tabla 21 (cont.). Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en branquias y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Hiperplasia de células caliciformes en branquiespinas	54.0	0.869	<0.001	0.983 ^{X2}	0.986 ^{X2}
Atrofia y/o pérdida de lamelas	58.8	0.811	<0.001	0.001 ^{X2}	0.001 ^{X2}
Necrosis	62.4	0.749	<0.001	0.009 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Detritus celulares en la luz	78.2	0.697	<0.001	0.001 ^{X2}	0.011 ^{RV}
Activación de células caliciformes	72.9	0.662	<0.001	0.006 ^{X2}	0.105 ^{X2}
Branquitis	87.3	0.456	<0.001	0.017 ^{X2}	0.503 ^{X2}
Hiperplasia interlamelar	91.8	0.206	<0.001	0.136 ^{X2}	0.165 ^{X2}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 22. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en el ojo y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Exoftalmítis	8.5	0.988	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Granulomas	11.6	0.985	<0.001	0.005 ^{RV}	0.005 ^{RV}
Necrosis	22.0	0.952	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Coroiditis	50.3	0.850	<0.001	<0.001 ^{X2}	0.003 ^{X2}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 23. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en meninges y encéfalo y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Granulomas en meninges	6.8	0.990	<0.001	0.010 ^{RV}	0.026 ^{RV}
Necrosis en encéfalo	13.0	0.974	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{X2}
Encefalitis	10.5	0.971	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Necrosis en meninges	23.7	0.969	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Ventriculitis	15.8	0.966	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Meningitis	35.3	0.946	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 24. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en el riñón y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Granulomas en intersticio renal	20.1	0.968	<0.001	0.065 ^{RV}	0.164 ^{RV}
Gotas hialinas en túbulo renales	23.2	0.956	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Necrosis en intersticio renal	37.9	0.939	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Paso de leucocitos en túbulo renales	37.0	0.904	<0.001	0.089 ^{X2}	0.006 ^{X2}
Activación de CMM en intersticio renal	55.1	0.880	<0.001	0.064 ^{RV}	0.248 ^{RV}
Necrosis/muerte de túbulo renales	39.5	0.880	<0.001	<0.001 ^{RV}	0.016 ^{X2}
Degeneración vacuolar en túbulo renales	44.6	0.871	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{RV}
Nefritis intersticial perivascular	84.5	0.621	0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 25. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en corazón y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Granulomas	12.7	0.985	<0.001	0.150 ^{RV}	0.191 ^{RV}
Hipertrofia del endocardio	10.5	0.975	<0.001	0.292 ^{RV}	0.776 ^{RV}
Miocarditis	8.5	0.971	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Necrosis	24.6	0.949	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Endocarditis	28.2	0.931	<0.001	0.002 ^{RV}	0.073 ^{RV}
Epicarditis	38.7	0.924	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 26. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en estómago y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Alteraciones glandulares en la mucosa	5.6	0.988	<0.001	0.050 ^{RV}	0.038 ^{RV}
Detritus celulares en luz	22.9	0.972	<0.001	0.083 ^{X2}	0.118 ^{X2}
Necrosis/muerte de submucosa gástrica	15.8	0.959	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Necrosis/muerte epitelio de mucosa gástrica	68.6	0.762	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Inflamación en submucosa	71.2	0.714	<0.001	<0.001 ^{X2}	0.023 ^{X2}
Inflamación en mucosa	64.7	0.706	<0.001	0.016 ^{RV}	0.103 ^{X2}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 27. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en intestino y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Material eosinofílico (proteína) en luz	5.9	0.993	<0.001	0.040 ^{RV}	0.057 ^{RV}
Degeneración hialina en muscular	6.5	0.989	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Necrosis/muerte en submucosa intestinal	10.5	0.977	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{X2}
Alteración de arquitectura de pliegues intestinales	13.8	0.970	<0.001	0.313 ^{X2}	0.146 ^{RV}
Inflamación en mucosa	20.6	0.951	<0.001	0.009 ^{X2}	0.002 ^{X2}
Liberación de moco en la luz	28.5	0.935	<0.001	0.426 ^{RV}	0.330 ^{X2}
Detritus celulares en la luz	43.5	0.928	<0.001	0.065 ^{RV}	0.084 ^{RV}
Necrosis/muerte en mucosa intestinal	40.7	0.922	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Inflamación en submucosa	62.1	0.763	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Activación de células caliciformes en mucosa	73.2	0.729	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Migración leucocitos en mucosa	73.7	0.688	<0.001	0.003 ^{RV}	0.011 ^{RV}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 28. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en hígado y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Activación de CMM	13.0	0.991	<0.001	0.134 ^{RV}	0.040 ^{RV}
Gotas hialinas en hepatocitos	6.5	0.983	<0.001	<0.001 ^{RV}	0.003 ^{RV}
Necrosis/muerte	16.7	0.971	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{X2}
Degeneración vacuolar en hepatocitos	35.0	0.896	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Hepatitis	51.7	0.885	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 29. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en hepatopáncreas y peritoneo/páncreas y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Necrosis en peritoneo/páncreas	5.6	0.995	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}
Activación de CMM en hepatopáncreas	22.6	0.978	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{X2}
Peritonitis/pancreatitis peritoneal	13.0	0.976	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{RV}
Necrosis de hepatopáncreas	15.3	0.975	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{X2}
Hepatopancreatitis	39.3	0.938	<0.001	<0.001 ^{RV}	<0.001 ^{RV}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 30. Correlación de la severidad y la extensión de las lesiones en bazo y su asociación con el tipo de muestreo

Lesión	Frecuencia (%)	Correlación severidad-extensión		Asociación con tipo de muestreo	
		d Somers	p	Severidad	Extensión
Granulomas	12.7	0.991	<0.001	0.364 ^{RV}	0.311 ^{RV}
Muerte de leucocitos	8.8	0.990	<0.001	0.072 ^{RV}	0.092 ^{RV}
Degeneración de eritrocitos	15.5	0.972	<0.001	0.630 ^{RV}	0.195 ^{RV}
Necrosis	22.6	0.964	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Esplenitis	40.7	0.884	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Depleción de linfocitos	55.9	0.879	<0.001	<0.001 ^{X2}	<0.001 ^{X2}
Activación de CMM	82.2	0.570	<0.001	0.004 ^{X2}	0.221 ^{X2}

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes

Todas las lesiones (n=69) mostraron una correlación estadística significativa entre severidad y extensión. De acuerdo con la Tabla 11, el 81.2% (n=56) de las lesiones mostraron una correlación muy alta entre severidad y extensión; el 14.5% (n=10) la correlación fue alta; el 2.9% (n=2) fue moderada y solo en el 1.4% (n=1) fue baja. Conforme a la interpretación de De Muth (2014), el grado de severidad de una lesión tiende a comportarse similar a su extensión, es decir, lesiones leves por lo general tienden a tener extensión focal y lesiones severas a ser de extensión generalizada. De tal suerte que las elevadas correlaciones entre la severidad y la extensión en la mayoría de las lesiones evaluadas en esta investigación permiten el empleo de cualquiera de estos dos criterios para la gradación de los daños en cualquier órgano. Este hallazgo facilita el trabajo de lo que siempre ha sido un dilema para los morfológicos en los estudios de histopatología, cuál de los dos o si ambos criterios son imprescindibles para calificar una lesión.

El segundo análisis adelantado en este apartado corresponde a la determinación de la asociación de las calificaciones de severidad y/o extensión con el tipo de muestreo. En este caso se encontró que en la mayoría de las lesiones (n=45, 65.2%), las calificaciones de la severidad y de la extensión en el muestreo aleatorio fueron significativamente diferentes a las observadas en el muestreo dirigido. Destacan las alteraciones en ojo (Tabla 22), sistema nervioso (Tabla 23) y buena parte de las localizadas en corazón (Tabla 25), todas las cuales son reportadas como comunes en el diagnóstico de estreptococosis, además de aquellas en hepatopáncreas y peritoneo/páncreas (Tabla 29), donde en general las calificaciones fueron superiores en las muestras procedentes de un muestreo dirigido.

De otro lado, otras lesiones (n=8, 11.6%) solo mostraron asociación con el tipo de muestreo en uno de los criterios: severidad (activación de células calciformes en branquias, branquitis, endocarditis, inflamación de la mucosa gástrica, material eosinófilo (proteína) en la luz intestinal y activación de CMM en bazo), o extensión (paso de leucocitos en túbulos renales y activación de CMM en hígado). En este caso al considerar el tipo de muestreo para la interpretación diagnóstica de las lesiones, lo recomendable sería evaluar el criterio

que estuviera estadísticamente asociada con el tipo de muestreo; en nuestra opinión, la mayor parte de estas alteraciones tienen un carácter inespecífico y por lo tanto no tendrían valor alguno para el diagnóstico de estreptococosis.

Finalmente en el 23.2% de las alteraciones (n=16) no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el tipo de muestreo y ambos criterios de calificaciones del cambio (degeneración del cartílago y hemorragias branquiales, arcobranquitis/branquiespinitis, hiperplasia de células calciformes en branquiespinas, hiperplasia interlamelar branquial, granulomas y activación de CMM en intersticio renal, hipertrofia del endocardio, granulomas en corazón, detritus celulares en luz estomacal e intestinal, liberación de moco en la luz intestinal y alteración arquitectura pliegues intestinales, y muerte de leucocitos, degeneración de eritrocitos y granulomas en bazo). Por lo tanto, la interpretación de estos criterios de calificación se puede hacer de manera independiente según el origen del muestreo, es decir, la distribución de las calificaciones observadas no fue diferente en peces procedentes del muestreo dirigido de la observada en peces muestreados aleatoriamente. En consecuencia, al estar correlacionadas la severidad y la extensión de los daños, y al estar ambos criterios de evaluación asociados con el tipo de muestreo, se podría utilizar indistintamente cualquiera de los dos.

Mención aparte merecen los granulomas en el corazón, meninges, bazo y ojo que, si bien le prestan alguna especificidad al diagnóstico de la estreptococosis, dado su carácter crónico parecen no ser una parte activa de la entidad; además, su frecuencia en los distintos órganos clave para la ubicación de las lesiones propias de la entidad es realmente baja. Según parece, estas estructuras servirían como un indicador de que los peces han estado expuestos a *S. agalactiae* sin que ello implique ineludiblemente desarrollo de la enfermedad.

De este apartado se puede concluir que en las alteraciones citadas es indistinto utilizar la severidad o la extensión de la lesión como criterio de evaluación debido a la alta correlación entre las calificaciones. En segundo lugar, se comprueba, como era de esperar, que de forma general las lesiones se presentan con mayor severidad y/o extensión en las muestras procedentes de un muestreo dirigido lo que indica una adecuada aplicación de criterios de selección de animales sintomáticos.

Con todo, existen algunas excepciones en las que las calificaciones de severidad y/o extensión de las lesiones fueron superiores en órganos y tejidos procedentes del muestreo aleatorio, en especial en branquias: atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales, desprendimiento de filamentos branquiales, detritus celulares en la luz branquial y branquitis; también en tracto digestivo: alteraciones glandulares en la mucosa gástrica, material eosinofílico (proteína) en la luz intestinal y migración de leucocitos en la mucosa intestinal. Este tipo de alteraciones, que son muy frecuentes de forma general y/o significativamente mayores en tilapias procedentes de un muestreo aleatorio, es posible que se trate de lesiones asociadas con mala calidad del agua y que aumentarían la

probabilidad de que estas mueran con algún tipo de patología (y por ese motivo no se encontrarían este tipo de lesiones en animales sintomáticos). Aunque parecen paradójicos estos resultados, se explicarían mediante el sesgo de Neyman que determina que la frecuencia de una variable puede ser menor en el grupo de animales enfermos ya que los individuos prevalentes son los incidentes supervivientes, es decir, cuando una determinada lesión favorece la muerte de un individuo se reduce la presencia, severidad y/o extensión de ella en los individuos supervivientes (Grimes y Schulz, 2002).

5.3.3. Asociación de la frecuencia de las lesiones con el diagnóstico de estreptococosis causada por *S. agalactiae* ST 260

La frecuencia de cada lesión en los peces estudiados según el diagnóstico negativo o positivo para estreptococosis y la existencia de asociación estadística significativa entre la lesión y el diagnóstico de estreptococosis se muestran en las Tablas 31 a 35, se siguen los mismos criterios utilizados en el apartado 5.3.1: muy frecuentes (n=19, Tabla 31), frecuentes (n=14, Tabla 32), moderadamente frecuentes (n=24, Tabla 33), poco frecuentes (n=12, Tabla 34) y muy poco frecuentes (n=35, Tabla 35).

En general, las lesiones fueron más frecuentes en los tejidos obtenidos de las tilapias diagnosticadas como positivas a estreptococosis comparados con las negativas y con diferencias significativas en particular en las lesiones con frecuencias mayores al 5%.

Como se mencionó en el apartado 5.3.1, la mayoría de las alteraciones muy frecuentes (por encima del 50%) en esta investigación tienen lugar en las mucosas respiratoria y gastrointestinal (Tabla 31); al analizarlas según el diagnóstico de estreptococosis se demuestran diferencias significativas en la mayoría de ellas y por lo general su frecuencia es mayor en los peces positivos a la entidad que en los negativos.

Hay que resaltar que en la mayor parte de las lesiones branquiales (excepto la activación de células caliciformes y necrosis en branquias) no hubo diferencias significativas según el diagnóstico de estreptococosis, pero además la única lesión con una frecuencia significativamente mayor en el grupo de tilapias negativas fue la atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales. Como lo demuestran estudios de nuestro grupo de investigación y experiencia diagnóstica, hasta la fecha no hemos encontrado ningún cambio en las branquias que hagan pensar en este órgano como diana para la infección y lesiones por *S. agalactiae*. Ahora bien, las lesiones en el tracto gastrointestinal pudieran deberse a la bacteria, no obstante, no poseen el carácter de especificidad que se les concede a aquellas en las que se basa el diagnóstico histopatológico de estreptococosis, esto se debe al hecho de que pueden ser debidas a otros agentes infecciosos o aun a causas inertes.

Una argumentación similar se podría aplicar a las alteraciones en órganos como el hígado, el bazo y riñón que, si bien pueden ser debidas a *S. agalactiae*, cambios similares se describen con mayor frecuencia en infecciones por otros patógenos como *E. tarda* o *A. hydrophila* (Miyazaki y Kaige, 1985; Rey et al., 2009; Chen et al., 2018; Davies et

al., 2018) y que podrían explicar sus altas frecuencias también en peces negativos a estreptococosis. Con respecto a la coroiditis, por el contrario, es una lesión más frecuentemente asociada a estreptococosis (Pulido et al., 2004; Ortega et al., 2016) que a cualquier otra infección.

Tabla 31. Lesiones muy frecuentes (>50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)

Órgano	Lesión	Frecuencia según diagnóstico (%)			
		Total	-	+	p
Branquias	Hiperplasia interlamelar branquial	91.8	92.7	90.7	0.501 ^{X2}
Branquias	Branquitis	87.3	85.4	89.5	0.250 ^{X2}
Riñón	Nefritis intersticial perivascular	84.5	75.0	95.7	<0.001 ^{X2}
Bazo	Activación de CMM en bazo	82.2	77.6	87.7	0.014 ^{X2}
Branquias	Detritus celulares en la luz branquial	78.2	77.6	79.0	0.749 ^{X2}
Intestino	Migración de leucocitos en mucosa intestinal	73.7	70.8	77.2	0.178 ^{X2}
Intestino	Activación células caliciformes en mucosa intestinal	73.2	68.8	78.4	0.041 ^{X2}
Branquias	Activación células caliciformes en branquias	72.6	65.6	80.9	0.001 ^{X2}
Estómago	Inflamación en submucosa gástrica	71.2	67.2	75.9	0.071 ^{X2}
Estómago	Necrosis/muerte en epitelio de mucosa gástrica	68.6	64.4	78.4	<0.001 ^{X2}
Estómago	Inflamación en mucosa gástrica	64.7	57.8	72.8	0.003 ^{X2}
Branquias	Necrosis en branquias	62.4	53.1	73.5	<0.001 ^{X2}
Intestino	Inflamación en submucosa intestinal	62.1	51.6	74.7	<0.001 ^{X2}
Branquias	Atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales	58.8	71.4	43.8	<0.001 ^{X2}
Bazo	Depleción linfocitos en bazo	55.6	40.6	73.5	<0.001 ^{X2}
Riñón	Activación de CMM en intersticio renal	55.1	42.7	69.8	<0.001 ^{X2}
Hígado	Hepatitis	51.7	32.8	74.1	<0.001 ^{X2}
Branquias	Hiperplasia células caliciformes en branquiespinas	54.0	55.2	52.5	0.606 ^{X2}
Ojo	Coroiditis	50.3	28.6	75.9	<0.001 ^{X2}

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Similar al comportamiento demostrado en el apartado 5.3.1, dentro de las lesiones frecuentes (Tabla 32) destaca la gran diferencia en las frecuencias según el diagnóstico de estreptococosis positivo y negativo en tres lesiones: la epicarditis (79.6% vs 4.2%), la meningitis (74.7% vs 2.1%), la esplenitis (60.5% vs 24.0%). Estas lesiones son reconocidas como muy compatibles con estreptococosis por diversos autores (Eldar et al., 1995; Pulido et al., 2004; Zamri-Saad et al., 2010; Alsaïd et al., 2013; Ortega et al., 2016) como se mencionó previamente y se ratifican en el presente estudio.

Frecuencias similares para la epicarditis (68.75%) y la meningitis (62.5%) se reportaron en tilapias provenientes de un brote de estreptococosis en Perú (Ortega et al., 2016); sin embargo, no hemos encontrado reportes de cuantificación de la frecuencia de las lesiones cuando se han descrito en otros estudios.

Tabla 32. Lesiones frecuentes (25-50% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)

Órgano	Lesión	Frecuencia según diagnóstico (%)			
		Total	-	+	p
Riñón	Degeneración vacuolar en túbulos renales	44.6	35.4	55.6	<0.001 ^{X2}
Intestino	Detritus celulares en la luz intestinal	43.5	38.5	49.4	0.040 ^{X2}
Bazo	Esplenitis	40.7	24.0	60.5	<0.001 ^{X2}
Intestino	Necrosis/muerte en mucosa intestinal	40.7	29.7	53.7	<0.001 ^{X2}
Riñón	Necrosis/muerte de túbulos renales	39.5	24.5	57.4	<0.001 ^{X2}
HP	Hepatopancreatitis	39.3	25.0	56.2	<0.001 ^{X2}
Corazón	Epicarditis	38.7	4.2	79.6	<0.001 ^{X2}
Riñón	Necrosis intersticial renal	37.9	19.8	59.3	<0.001 ^{X2}
Riñón	Paso de leucocitos en túbulos renales	37.0	33.3	41.4	0.119 ^{X2}
Sist.nerv.	Meningitis	35.3	2.1	74.7	<0.001 ^{X2}
Hígado	Degeneración vacuolar en hepatocitos	35.0	24.0	48.1	<0.001 ^{X2}
Branquias	Arcobranquitis/branquiespinitis	32.8	30.7	35.2	0.374 ^{X2}
Intestino	Liberación de moco en la luz intestinal	28.5	28.1	29.0	0.854 ^{X2}
Corazón	Endocarditis	28.2	14.6	44.4	<0.001 ^{X2}

HP: Hepatopáncreas

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Alteraciones con frecuencia total moderada (Tabla 33) y poco frecuente (Tabla 34) diferentes autores, nuestros estudios previos y el presente trabajo, las consideran como características de la enfermedad estreptocócica. Hay que indicar que en esta investigación se confirman una vez más los anteriores hallazgos, toda vez que se encontraron diferencias estadísticas significativas con frecuencias elevadas en individuos diagnosticados como positivos a estreptococosis mientras que estuvieron prácticamente ausentes en tilapias negativas a esta enfermedad.

Las alteraciones, por lo demás, coinciden con las citadas por otros autores: necrosis en corazón (53.7% vs 0.0%), meninges (51.9% vs 0.0%), bazo (45.1% vs 3.6%), ojo (43.8 vs 3.6%), encéfalo (28.4% vs 0.0%) e hígado (31.5% vs 4.2%); ventriculitis (34% vs 0.5%), encefalitis (22.8% vs 0.0%), miocarditis (18.5% vs 0.0%) y exoftalmatitis (16.7% vs 1.6%); y granulomas en corazón (27.2% vs 0.5%), bazo (26.5% vs 1.0%), ojo (24.1% vs 1.0%), meninges (14.8% vs 0.0%) e intersticio renal (29.0% vs 12.5%) (Eldar et al., 1994; Eldar et al., 1995; Pulido et al., 2004; Hernández, 2009; Delamare-Deboutteville et al., 2015; Ortega et al., 2016).

Tabla 33. Lesiones con frecuencia moderada (10-25% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)

Órgano	Lesión	Frecuencia según diagnóstico (%)			
		Total	-	+	p
Corazón	Necrosis en corazón	24.6	0.0	53.7	<0.001 ^{X2}
Sist. nerv.	Necrosis en meninges	23.7	0.0	51.9	<0.001 ^{X2}
Riñón	Gotas hialinas en túbulos renales	23.2	15.6	32.1	<0.001 ^{X2}
Estómago	Detritus celulares en la luz gástrica	22.9	22.9	22.8	0.986 ^{X2}
HP	Activación de CMM en hepatopáncreas	22.6	9.4	38.3	<0.001 ^{X2}
Bazo	Necrosis en bazo	22.6	3.6	45.1	<0.001 ^{X2}
Ojo	Necrosis en ojo	22.0	3.6	43.8	<0.001 ^{X2}
Intestino	Inflamación en mucosa intestinal	20.6	16.7	25.3	0.045 ^{X2}
Riñón	Granulomas en intersticio renal	20.1	12.5	29.0	<0.001 ^{X2}
Hígado	Necrosis/muerte en hígado	16.7	4.2	31.5	<0.001 ^{X2}
Estómago	Necrosis/muerte en submucosa gástrica	15.8	7.3	25.9	<0.001 ^{X2}
Sist. nerv.	Ventriculitis	15.8	0.5	34.0	<0.001 ^{X2}
Bazo	Degeneración eritrocitos en bazo	15.5	9.9	22.2	0.001 ^{X2}
HP	Necrosis en hepatopáncreas	15.3	1.6	31.5	<0.001 ^{X2}
Intestino	Alteración arquitectura pliegues intestinales	13.8	13.5	14.2	0.859 ^{X2}
P/P	Peritonitis/pancreatitis peritoneal	13.0	6.8	20.4	<0.001 ^{X2}
Hígado	Activación de CMM en hígado	13.0	8.9	17.9	0.012 ^{X2}
Sist. nerv.	Necrosis en encéfalo	13.0	0.0	28.4	<0.001 ^{X2}
Bazo	Granulomas en bazo	12.7	1.0	26.5	<0.001 ^{X2}
Corazón	Granulomas en corazón	12.7	0.5	27.2	<0.001 ^{X2}
Ojo	Granulomas en ojo	11.6	1.0	24.1	<0.001 ^{X2}
Intestino	Necrosis/muerte en submucosa intestinal	10.5	4.2	17.9	<0.001 ^{X2}
Sist. nerv.	Encefalitis	10.5	0.0	22.8	<0.001 ^{X2}
Corazón	Hipertrofia del endocardio	10.5	7.8	13.6	0.077 ^{X2}

HP: Hepatopáncreas; P/P: Peritoneo/páncreas

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Interesantes hallazgos son los cambios en el hepatopáncreas como inflamación (56,2% vs 25%) (Tabla 32), activación de CMM (38.3% vs 9.4%), necrosis (31.5% vs 1.6%) (Tabla 33) y granulomas (5.6% vs 1.0%) (Tabla 35) en este órgano, todos los cuales demostraron diferencias significativas; en nuestra opinión estas alteraciones tendrían una alta especificidad para estreptococosis toda vez que no las hemos visto en otras enfermedades de la especie, por lo que debieran ser tenidas en cuenta cada vez más en el diagnóstico de la entidad; se debe señalar que estas lesiones no han sido citadas por otros autores como relevantes en el diagnóstico de esta enfermedad.

Dos alteraciones en branquias como: el desprendimiento de filamentos (3.7% vs 9.9%) y la degeneración del cartílago branquial (2.5% vs 8.3%), que fueron menos frecuentes en las tilapias positivas comparadas con las negativas (Tabla 34), pueden tener la misma interpretación que los cambios más frecuentes antes citados.

Tabla 34. Lesiones poco frecuentes (5-10% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)

Órgano	Lesión	Frecuencia según diagnóstico (%)			
		Total	-	+	p
Bazo	Muerte de leucocitos en bazo	8.8	2.1	16.7	<0.001 ^{X2}
Branquias	Hemorragias en branquias	8.5	5.7	11.7	0.043 ^{X2}
Corazón	Miocarditis	8.5	0.0	18.5	<0.001 ^{X2}
Ojo	Exoftalmitis	8.5	1.6	16.7	<0.001 ^{X2}
Branquias	Desprendimiento filamentos branquiales	7.1	9.9	3.7	0.023 ^{X2}
Sist. nerv.	Granulomas en meninges	6.8	0.0	14.8	<0.001 ^{X2}
Intestino	Degeneración hialina en muscular intestinal	6.5	0.5	13.6	<0.001 ^{X2}
Hígado	Gotas hialinas en hepatocitos	6.5	4.2	9.3	0.053 ^{X2}
Intestino	Material eosinofílico (proteína) en la luz intestinal	5.9	6.8	4.9	0.467 ^{X2}
P/P	Necrosis en peritoneo/páncreas	5.6	1.6	10.5	<0.001 ^{X2}
Branquias	Degeneración del cartílago branquial	5.6	8.3	2.5	0.017 ^{X2}
Estómago	Alteraciones glandulares en mucosa gástrica	5.6	6.8	4.3	0.320 ^{X2}

P/P: Peritoneo/páncreas

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

De las 35 lesiones muy poco frecuentes (<5%) (Tabla 35) solo se obtuvo significancia según el diagnóstico a estreptococosis en 9 de ellas, estas fueron muy poco frecuentes o estuvieron ausentes en tejidos procedentes de tilapias negativas: endoftalmitis (7.4% vs 0.5%, peces positivos vs negativos, respectivamente), granulomas en encéfalo (6.2% vs 0.0%) y en hepatopáncreas (5.6% vs 1.0%), inflamación en la capa muscular intestinal (5.6% vs 1.6%), pigmentos intracelulares en hepatocitos (4.9% vs 1.0%), necrosis/muerte en la capa muscular intestinal (4.3% vs 0.0%), panoftalmitis (3.1% vs 0.0%) y granulomas con centro activo en encéfalo y meninges (2.5% vs 0.0%).

A pesar de su muy baja frecuencia aun en peces positivos a la patología, la endoftalmitis y la panoftalmitis, los granulomas en el encéfalo y aquellos con centro activo y en las meninges, se deben considerar como característicos de estreptococosis, aunque no necesariamente deban ingresar a sistemas de diagnóstico automatizados. De otro lado, estas mismas lesiones con frecuencias muy bajas en tilapias negativas a la entidad seguramente se deben a infecciones leves con *S. agalactiae*.

Tabla 35. Lesiones muy poco frecuentes (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)

Órgano	Lesión	Frecuencia según diagnóstico (%)			
		Total	-	+	p
Estómago	Inflamación muscular gástrica	4.0	2.6	5.6	0.156 ^{X2}
Estómago	Degeneración hialina en muscular gástrica	4.0	3.1	4.9	0.383 ^{X2}
Ojo	Endoftalmitis	3.7	0.5	7.4	0.001 ^{X2}
Hígado	Granulomas en hígado	3.7	2.1	5.6	0.084 ^{X2}
Intestino	Inflamación en muscular intestinal	3.4	1.6	5.6	0.039 ^{X2}
Riñón	Nefrocalcinosis en túbulos renales	3.4	3.1	3.7	0.764 ^{X2}
HP	Granulomas en hepatopáncreas	3.1	1.0	5.6	0.015 ^{X2}
Estómago	Granulomas en submucosa gástrica	3.1	1.6	4.9	0.068 ^{X2}
Riñón	Glomerulitis	3.1	1.6	4.9	0.068 ^{X2}
Hígado	Pigmentos intracelulares en hepatocitos	2.8	1.0	4.9	0.029 ^F
Sist. nerv.	Granulomas en encéfalo	2.8	0.0	6.2	<0.001 ^F
Branquias	Granulomas en branquias	2.8	2.6	3.1	0.516 ^F
P/P	Granulomas en peritoneo/páncreas	2.5	2.6	2.5	0.604 ^F
Intestino	Necrosis/muerte en muscular intestinal	2.0	0.0	4.3	0.004 ^F
Hígado	Alteraciones nucleares en hepatocitos	2.0	2.1	1.9	0.593 ^F
Ojo	Panoftalmitis	1.4	0.0	3.1	0.019 ^F
P/P	Activación de CMM en peritoneo/páncreas	1.4	1.0	1.9	0.420 ^F
Sist. nerv.	Granulomas con centro activo en encéfalo	1.1	0.0	2.5	0.043 ^F
Sist. nerv.	Granulomas con centro activo en meninges	1.1	0.0	2.5	0.043 ^F
Estómago	Ulceraciones en mucosa gástrica	1.1	1.0	1.2	0.622 ^F
Riñón	Hemorragias en intersticio de riñón	1.1	0.5	1.9	0.251 ^F
Estómago	Granulomas en mucosa gástrica	0.8	0.0	1.9	0.095 ^F
Estómago	Necrosis/muerte en muscular gástrica	0.8	0.5	1.2	0.436 ^F
Intestino	Granulomas en submucosa intestinal	0.8	0.5	1.2	0.436 ^F
Riñón	Granulomas con centro activo en intersticio renal	0.8	0.0	1.9	0.095 ^F
Riñón	Granulomas en túbulos renales	0.8	0.0	1.9	0.095 ^F
Corazón	Granulomas con centro activo en corazón	0.6	0.0	1.2	0.209 ^F
Hígado	Granulomas con centro activo en hígado	0.6	0.0	1.2	0.209 ^F
Intestino	Granulomas con centro activo en submucosa intestinal	0.6	0.0	1.2	0.209 ^F
Ojo	Granulomas con centro activo en ojo	0.6	0.5	0.6	0.707 ^F
P/P	Granulomas con centro activo en peritoneo/páncreas	0.3	0.0	0.6	0.458 ^F
Bazo	Granulomas con centro activo en bazo	0.3	0.0	0.6	0.458 ^F
Estómago	Granulomas en muscular gástrica	0.3	0.0	0.6	0.458 ^F
Hígado	Hemorragias en hígado	0.3	0.0	0.6	0.458 ^F
Intestino	Ulceraciones en mucosa intestinal	0.3	0.0	0.6	0.458 ^F

HP: Hepatopáncreas; P/P: Peritoneo/páncreas

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; F: Significación estadística según la prueba exacta de Fisher

A pesar de la alta especificidad que pueda otorgar la evidencia de bacterias con forma de cocos compatibles con *S. agalactiae* en el contexto de las lesiones, la demostración de estos microorganismos fue menos frecuente en particular en aquellas tilapias con diagnóstico negativo de estreptococosis. La presencia de estos cocos fue poco frecuente (frecuencias totales) en los órganos considerados blanco específicos del patógeno como el corazón (7.1%), bazo (5.4%), meninges (5.1%) y muy poco frecuentes en ojo (2.5%) y encéfalo (2.3%) (Tablas 36 y 37); este hallazgo pudiera en parte explicar lo antes señalado en el apartado 5.1, respecto al bajo aislamiento por métodos bacteriológicos del patógeno y corrobora lo demostrado por Hernández et al. (2009) sobre la mayor sensibilidad y especificidad de la histopatología frente a la microbiología para el diagnóstico de *S. agalactiae*.

Sin embargo, se debe destacar, el aumento significativo de la frecuencia de bacterias cocoides cuando se analizan las tilapias positivas al diagnóstico de estreptococosis (Tablas 36 y 37): la observación de cocos fue del 15.4% en el corazón, 11.7% en el bazo, 11.1% en meninges, 5.6% en ojo, 4.9% en encéfalo, mientras que estuvieron ausentes en todos los peces negativos. Ortega et al. (2016) tuvieron resultados análogos y encontraron buenas asociaciones entre pruebas de detección de ADN de *S. agalactiae* mediante la técnica de PCR en tiempo real versus la presencia de lesiones compatibles con la enfermedad; aún más, estos autores concuerdan con nuestros estudios previos y el presente, en el sentido de que identificar el agente infeccioso o el ADN en los tejidos no significa que el pez esté enfermo, y sostienen que para obtener un diagnóstico confiable de la enfermedad es necesario que la detección molecular del patógeno se relacione con la anamnesis y con pruebas de diagnóstico de lesiones como la histopatología.

Tabla 36. Agentes etiológicos (>5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)

Órgano	Agente etiológico	Frecuencia según diagnóstico (%)			
		Total	-	+	p
Branquias	Monogeneos en branquias	51.4	43.2	61.1	0.001 ^{X2}
Branquias	Materia orgánica en branquias	50.0	50.5	49.4	0.831 ^{X2}
Branquias	<i>Trichodinas-Chilodonellas</i> en branquias	45.5	42.2	49.4	0.176 ^{X2}
Branquias	<i>Epitheliocystis</i> en branquias	39.5	34.9	45.1	0.051 ^{X2}
Branquias	Mixosporidios en branquias	10.5	13.5	6.8	0.039 ^{X2}
Branquias	Trematodos digeneos en branquias	7.1	7.3	6.8	0.854 ^{X2}
Corazón	Bacterias cocos en corazón	7.1	0.0	15.4	<0.001 ^{X2}
Bazo	Bacterias cocos en bazo	5.4	0.0	11.7	<0.001 ^{X2}
Branquias	Bacterias cocos en branquias	5.1	2.6	8.0	0.021 ^{X2}
Sist. nerv.	Bacterias cocos en meninges	5.1	0.0	11.1	<0.001 ^{X2}

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Las Tablas 19 y 36 son un buen ejemplo de lo antes citado: como se ve, excepto por los cocos, las poblaciones de parásitos eran similares entre los dos grupos de muestreo y los peces negativos a estreptococosis tienen altas cargas parasitarias que tienden a conservarse en los animales positivos a la enfermedad; excepción hecha a los monogéneos que muestran un aumento significativo (de 43.2% a 61.1%, $p < 0.001$) y los mixosporidios con cargas moderadas que tienden a disminuir de manera significativa (de 13.5% a 6.8%).

Tabla 37. Agentes etiológicos (<5% en la muestra estudiada): frecuencias expresadas en porcentaje y su asociación con el diagnóstico de estreptococosis (-: negativo y +: positivo)

Órgano	Agente etiológico	Frecuencia según diagnóstico (%)			
		Total	-	+	p
Intestino	Bacterias coco-bacilos en intestino	3.1	2.6	3.7	0.553 ^{X2}
Ojo	Bacterias cocos en ojo	2.5	0.0	5.6	0.001 ^F
Sist. nerv.	Bacterias cocos en encéfalo	2.3	0.0	4.9	0.002 ^F
Hígado	Bacterias cocos en hígado	2.0	0.0	4.3	0.004 ^F
Intestino	Bacterias cocos en intestino	1.7	0.5	3.1	0.073 ^F
Estómago	Bacterias cocos en estómago	1.1	1.0	1.2	0.622 ^F
Intestino	Parásitos en intestino	1.1	1.6	0.6	0.378 ^F
Abdomen	Bacterias cocos en peritoneo/páncreas	0.8	0.0	1.9	0.095 ^F
Branquias	<i>Microsporidium</i> en branquias	0.8	0.5	1.2	0.436 ^F
Intestino	Bacterias bacilos en intestino	0.8	1.6	0	0.158 ^F
Riñón	Bacterias cocos en riñón	0.8	0.0	1.9	0.095 ^F
Branquias	Bacterias bacilos en branquias	0.6	1.0	0.0	0.293 ^F
Branquias	<i>Ichthyophthirius</i> en branquias	0.6	0.5	0.6	0.707 ^F
Branquias	<i>Piscinoodinium</i> en branquias	0.6	0.5	0.6	0.707 ^F
Estómago	Bacterias cocos en submucosa de estómago	0.6	0.0	1.2	0.209 ^F
Estómago	Parásitos en estómago	0.3	0.5	0.0	0.542 ^F
Estómago	Parásitos en submucosa de estómago	0.3	0.5	0.0	0.542 ^F
Hígado	Parásitos en hígado	0.3	0.5	0.0	0.542 ^F

X2: Significación estadística según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; F: Significación estadística según la prueba exacta de Fisher

5.3.4. Lesiones correlacionadas con el diagnóstico de estreptococosis causada por *S. agalactiae* ST 260

En este apartado se muestran los resultados significativos de los análisis para establecer si el diagnóstico de estreptococosis estaba correlacionado con el criterio severidad y/o extensión de cada una de las lesiones en cada tipo de muestreo según la prueba d de Somers. De las 69 lesiones con frecuencias superiores al 5%, el 82.6% ($n=57$) tuvieron correlación significativa de manera general con la enfermedad, es decir, sin considerar el tipo de muestreo (Anexo 3).

De acuerdo con la categorización del grado de correlación según el coeficiente d de Somers especificado en la Tabla 11, se muestran las lesiones correlacionadas de forma moderada a alta (superior a 0.4) con la estreptococosis por *S. agalactiae* ST 260 en tilapias cultivadas en Colombia, tanto en animales procedentes del muestreo aleatorio (asintomáticos) como del muestreo dirigido (sintomáticos). Las lesiones fueron ordenadas de forma decreciente de acuerdo con los coeficientes de correlación d de Somers entre la estreptococosis y la severidad y/o la extensión, teniendo en cuenta la frecuencia de la lesión según el tipo de muestreo aleatorio (Tabla 38), dirigido (Tabla 39) o sin considerar el tipo de muestreo (Tabla 40). En todos los casos, la correlación entre severidad y extensión fue superior a 0.850 (Tablas 21 a 30), lo que indica que se puede utilizar indistintamente cualquiera de estos dos criterios. Aquellas lesiones con una correlación baja o muy baja (<0.4) se incluyen en el Anexo 4.

A continuación se muestran las lesiones donde el criterio de severidad y/o de extensión, tanto en el muestreo aleatorio (Tabla 38) como en el dirigido (Tabla 39), demuestran una correlación alta o moderada con el diagnóstico positivo a estreptococosis; aunque se presentan en tablas separadas algunas de estas alteraciones bien podrían ser evaluadas en tilapias procedentes de cualquiera de los dos tipos de muestreo, dado que la asociación con el diagnóstico positivo de la patología fue significativa en ambos tipos de muestreo.

En los peces que se tomaron de forma aleatoria (Tabla 38) se identificaron 10 lesiones con alta correlación con estreptococosis y 4 cuya correlación fue moderada. Destacan las lesiones de tipo inflamatorio y regresivo en corazón (epicarditis, miocarditis y necrosis); en SNC (meningitis, encefalitis, ventriculitis, granulomas en meninges y necrosis en meninges y encéfalo); en ojo (granuloma y necrosis), bazo (necrosis) y hepatopáncreas e hígado (necrosis y muerte de hepatocitos). Solo la epicarditis es una alteración frecuente, mientras que el resto son de frecuencia moderada ($n=5$), poco frecuentes ($n=5$) o muy poco frecuentes ($n=3$).

En contraste, en peces procedentes de muestreo dirigido (Tabla 39) solo se identificaron 9 lesiones correlacionadas de forma moderada con estreptococosis. Con excepción de granulomas en meninges, encefalitis, miocarditis, necrosis en hepatopáncreas, necrosis/muerte de hepatocitos y granulomas en el ojo, que tuvieron correlación baja con la patología en el muestro dirigido, las demás lesiones son las mismas que en el aleatorio; solo la coroiditis no estuvo presente en el muestreo aleatorio debido a su baja correlación (Anexo 4). Sin embargo, en el muestreo dirigido 6 alteraciones fueron muy frecuentes o frecuentes ($n=3$), con diferencias por lo menos 2 a 6 veces mayores (necrosis en encéfalo) con relación al muestreo aleatorio.

Tabla 38. Lesiones con correlación alta o moderada entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias del muestreo aleatorio

Lesión	Frec. (%) muestreo aleatorio	Correlación severidad-estreptoc.		Correlación extensión-estreptoc.	
		d Somers	p	d Somers	p
Epicarditis	27.5	0.722	<0.001	0.724	<0.001
Necrosis en meninges	11.7	0.706	<0.001	0.708	<0.001
Necrosis en corazón	11.3	0.708	<0.001	0.704	<0.001
Meningitis	23.1	0.696	<0.001	0.701	<0.001
Necrosis en encéfalo	5.3	0.669	<0.001	0.667	<0.001
Granulomas en meninges	4.5	0.665	<0.001	0.665	<0.001
Encefalitis	3.2	0.658	0.003	0.663	0.003
Miocarditis	2.8	0.657	0.006	0.660	0.006
Ventriculitis	8.9	0.640	<0.001	0.648	<0.001
Necrosis en hepatopáncreas	6.5	0.619	<0.001	0.619	<0.001
Granulomas en ojo	7.7	0.570	<0.001	0.574	<0.001
Necrosis en bazo	9.7	0.560	<0.001	0.558	<0.001
Necrosis en ojo	11.7	0.486	<0.001	0.490	<0.001
Necrosis/muerte en hígado	12.1	0.450	<0.001	0.459	<0.001

Tabla 39. Lesiones con correlación moderada entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias del muestreo dirigido

Lesión	Frec. (%) muestreo dirigido	Correlación severidad-estreptoc.		Correlación extensión-estreptoc.	
		d Somers	p	d Somers	p
Meningitis	63.6	0.562	<0.001	0.538	<0.001
Necrosis en meninges	51.4	0.514	<0.001	0.504	<0.001
Epicarditis	64.5	0.500	<0.001	0.511	<0.001
Necrosis en corazón	55.1	0.501	<0.001	0.498	<0.001
Coroiditis	59.8	0.451	<0.001	0.453	<0.001
Necrosis en ojo	45.8	0.435	<0.001	0.444	<0.001
Necrosis en encéfalo	30.8	0.397	<0.001	0.415	<0.001
Necrosis en bazo	52.3	0.414	<0.001	0.402	<0.001
Ventriculitis	31.8	0.395	<0.001	0.409	<0.001

Por otro lado, en la Tabla 40 se incluye el grupo de lesiones donde la calificación de la severidad y de la extensión de cada una de ellas, independiente del tipo de muestreo, estuvieron correlacionadas de forma moderada con el diagnóstico positivo a estreptococosis. Este grupo de alteraciones podrían evaluarse en tilapias de un origen incierto en cuanto a la toma de la muestra.

Los granulomas son una forma de respuesta de defensa bastante específica de los peces frente a *S. agalactiae* ST 260 y se ha descrito su predilección por ciertos órganos como encéfalo, epicardio, coroides, esclerótica, bazo y riñón (Pulido et al., 2004), ubicación que fue confirmada numéricamente en esta investigación (Tablas 38 y 40) y por Pulido et al. (2010) mediante la técnica de hibridación *in situ*. De otro lado, la muerte de leucocitos en el bazo, aunque fue poco frecuente de forma general y es un cambio que también se observa en otras entidades infecciosas de la tilapia, resultó con una correlación moderada y debe tenerse en consideración el aumento de su frecuencia en tilapias positivas a la enfermedad (16.7% vs 2.1%) o provenientes de muestreos dirigidos (14.0% vs 6.5%).

Tabla 40. Lesiones con correlación moderada entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias sin considerar tipo de muestreo

Lesión	Frec. (%) muestreo total	Correlación severidad-estreptoc.		Correlación extensión-estreptoc.	
		d Somers	p	d Somers	p
Granulomas en corazón	12.7	0.573	<0.001	0.576	<0.001
Granulomas en bazo	12.7	0.548	<0.001	0.550	<0.001
Muerte de leucocitos en bazo	8.8	0.449	<0.001	0.444	<0.001

En esta fase del estudio se obtuvo un listado de lesiones con base a criterios estadísticos que permiten emitir diagnósticos confiables de estreptococosis por *S. agalactiae* ST 260 en tilapias; buena parte de estas lesiones (Tablas 38 a 40) ya eran reconocidas de manera subjetiva-descriptiva como propias de la entidad por diversos autores en peces enfermos de manera natural o experimental (Eldar et al., 1994; Eldar et al., 1995; Pulido et al., 2004; Chen et al., 2007; Hernández et al., 2009; Liu et al., 2014; Delamare-Deboutteville et al., 2015).

Como se dejó claro en trabajos previos de nuestro grupo, la histopatología resultó una técnica mucho más sensible y específica dentro del contexto del diagnóstico poblacional de estreptococosis por *S. agalactiae* en tilapias, 100% de sensibilidad y especificidad de acuerdo con Hernández et al. (2009) aunque la técnica de bacteriología se considera la prueba de oro (*gold standard*) que, aunque más específica (96.1%), resultó menos sensible (30.8%) que la primera (Hernández et al., 2009).

En el diagnóstico de rutina de la forma tradicional, la especificidad de las lesiones debidas a *S. agalactiae* en tilapias depende de su ubicación bastante precisa en tres órganos, principalmente: en el encéfalo: las meninges, el ventrículo del mesencéfalo y el parénquima; en el corazón: el epicardio y el miocardio; y en el ojo, la coroides (Eldar et al., 1994; Eldar et al., 1995; Pulido et al., 2004; Hernández et al., 2009; Delamare-Deboutteville et al., 2015; Iregui et al., 2019). Este estudio confirma por estadística los anteriores hallazgos, de tal suerte que las lesiones características tuvieron una

correlación moderada a alta con estreptococosis en los tres órganos mencionados: encéfalo, corazón y ojo. También depende la especificidad de la entidad, de una morfología de los cambios histológicos bien definida y de la tendencia a la cronicidad; finalmente, se podría pensar en una “especificidad” otorgada por la frecuencia de las alteraciones características en la población; contrario a lo que se pudiera pensar, la especificidad de las alteraciones en términos poblacionales no está relacionada con las lesiones de mayor frecuencia, sino con las que se presentan con frecuencias que están entre el 25-50% o por debajo de esta cifra. Parece una paradoja, pero las lesiones muy frecuentes (> 50%) (Tablas 14 y 31), por contraste, presentan una menor especificidad ya que indican etiologías más comunes (como la deficiente calidad del agua) o la presencia de fenómenos inespecíficos.

Según se puede derivar de la Tabla 39, se podría sugerir que el curso de la estreptococosis por *S. agalactiae* ST260 tiene una forma subaguda caracterizada morfológicamente por inflamación mononuclear activa y necrosis, durante la cual se manifiestan signos clínicos, y una forma crónica asintomática o subclínica con la formación de granulomas (Tablas 38 y 40), aunque pueden existir superposiciones entre ambas formas. No obstante, pueden existir lesiones un tanto más agudas que bien pueden deberse a la bacteria, pero que por su ubicación en tejidos del tracto gastrointestinal, riñón, bazo e hígado (localizaciones que son más frecuentes para infecciones por *E. tarda*), y además del nulo desarrollo ulterior hacia la cronicidad en estas localizaciones no pueden adjudicarse a *S. agalactiae* de manera por completo confiable; es por ello que con miras a la “especificidad” histológica de estreptococosis se han privilegiado aquellas lesiones que se resumen en las Tablas 38 y 39.

De igual manera se puede concluir de las Tablas 38 y 39, que mientras el promedio del porcentaje de frecuencias de lesiones correlacionadas con estreptococosis en un muestreo aleatorio es de 10.4%, en el muestreo dirigido fue de 50.6%, es decir más de 5 veces. Dos interpretaciones se podrían derivar de las anteriores cifras. La primera es que las nueve lesiones calculadas como indicadoras de estreptococosis demuestran su solidez, no solo en el diagnóstico enteramente subjetivo tradicional de la entidad, sino que estas mismas alteraciones tienen gran potencial para su futura utilización en el diagnóstico en sistemas automatizados. Y, en segundo lugar, que también desde el punto de vista epidemiológico se podría derivar una conclusión altamente significativa en el contexto de poblaciones de tilapias y es que mientras el promedio de la frecuencia de las lesiones típicas de estreptococosis se mantenga alrededor de 10% no habrá enfermedad clínica. Esta última conclusión se ratifica al observar frecuencias significativamente superiores entre las tilapias positivas a estreptococosis frente a las negativas, por ejemplo, epicarditis (79.6% vs 4.2%) y meningitis (74.7% vs 2.1%) (Tablas 31 a 36), lo cual indicaría que los peces con signos clínicos probablemente tienen enfermedad estreptocócica.

Esto concuerda con la relación que existe entre el grado de exposición al patógeno y la frecuencia, la severidad y la extensión de las lesiones, de manera que en los peces no expuestos las lesiones serán de frecuencia baja, poco severas y de escasa extensión, mientras que en los peces expuestos las lesiones serán de frecuencia alta, muy severas y extensas (Bush et al., 1997; McClure et al., 2004). Además, estos resultados dan fortaleza a nuestra hipótesis de que la muerte de los animales con estreptococosis por *S. agalactiae* ST260 se debe más al acúmulo de lesiones antes que a la presencia o liberación de sustancias con propiedades tóxicas (Iregui et al., 2015).

5.4. Fase 3: Desarrollo de modelos histopatológicos para el diagnóstico de estreptococosis causada por *S. agalactiae* ST 260

5.4.1. Construcción de los modelos

De acuerdo con la asociación de la severidad y la extensión de las lesiones con el tipo de muestreo: dirigido (peces seleccionados con signos) o aleatorio (peces en su mayor parte sanos) y su correlación con el diagnóstico de estreptococosis, se generaron cuatro modelos de regresión logística; en cada uno se incluyeron las lesiones asociadas a cada muestreo independiente de su grado de correlación (Anexo 3).

- 1. Modelo general simple:** se aplicaría a tilapias de las cuales se desconoce el tipo de muestreo, bien sea aleatorio o dirigido, dado que utiliza las lesiones cuyas calificaciones de severidad y extensión son independientes del tipo de muestreo.
- 2. Modelo general avanzado:** se aplicaría a tilapias que proceden bien sea de muestreos aleatorios o dirigidos dado que utiliza las lesiones cuyas calificaciones de severidad y/o extensión tuvieron correlación significativa con el diagnóstico de la enfermedad tanto en el muestreo aleatorio como en el dirigido.
- 3. Modelo aleatorio:** se aplicaría a tilapias en su mayor parte sanas que provengan de muestreos aleatorios utilizando lesiones cuya severidad y/o extensión sólo estuvieron correlacionadas con el diagnóstico para las muestras aleatorias.
- 4. Modelo dirigido:** se aplicaría a tilapias con signos de enfermedad que procedan de muestreos dirigidos utilizando lesiones cuya severidad y/o extensión sólo se correlacionaron con el diagnóstico de la enfermedad para las muestras dirigidas.

La prueba de regresión logística con el método “hacia adelante condicional” permite conservar las variables independientes (lesiones) que aportan evidencia al diagnóstico positivo de estreptococosis (variable dependiente) o prescindir de las que no, debido a su redundancia. Los coeficientes β permiten interpretar los efectos que tienen las lesiones (variables independientes) sobre la estreptococosis (variable dependiente), es

decir, cuál es la contribución de cada una de ellas, suponiendo que el resto de las variables no cambian.

La significancia de cada modelo se estimó mediante el coeficiente de determinación (R^2) de Nagelkerke, el cual toma valores entre 0 y 1; 0 indica un efecto nulo de las variables independientes sobre el diagnóstico, mientras que en las proximidades de 1 mostraría un efecto considerable. Debido al tamaño limitado de la muestra y a la existencia de cuatro grados de calificación para cada lesión, es probable que el procedimiento estadístico utilizado en la regresión logística mantenga algunas lesiones sin que tengan significancia en el modelo final, puesto que mantenerlas mejoraría la capacidad predictiva del modelo. En ocasiones el valor de p es sumamente alto para algunas calificaciones y a pesar de ello se mantiene la variable (lesión) en el modelo, lo que se debe a que ningún animal negativo a la enfermedad presentó ese grado de calificación de la severidad o la extensión.

5.4.1.1. Modelo general simple

Para la construcción de este modelo se tomaron las calificaciones de severidad o extensión de todos los peces seleccionados para el estudio ($n=354$) y también los incluidos para el estudio de concordancias ($n=35$), tanto los procedentes del muestreo al azar como los del dirigido.

De acuerdo con los resultados de la Fase 2, para el modelo inicial de regresión se incluyeron las lesiones ($n=10$) (Tabla 40 y Anexo 4.3) cuyas calificaciones de severidad y de extensión se comportaron diferente en cada uno de los muestreos al azar o dirigido, aunque de todas formas resultaron asociadas al diagnóstico de estreptococosis. Se selecciona el criterio de severidad o extensión que tenga un mayor coeficiente d de Somers. Además del agente causal de la enfermedad (*S. agalactiae*) se incluyeron otros patógenos que se correlacionaron con la enfermedad, igualmente con diferencias en los muestreos (Anexo 5.1).

Las lesiones que finalmente se seleccionaron en este modelo mediante el procedimiento de la regresión logística se presentan en la Tabla 41. La prueba seleccionó las lesiones, así como la calificación de severidad o de extensión, que deben ser incluidas en el modelo. En este modelo también quedó incluida la presencia de bacterias cocoides en las branquias, lo que le confiere mayor especificidad al modelo dado que se aplicaría a muestras donde no se conoce la procedencia de las tilapias (al azar o enfermas). En este caso se obtuvo un modelo significativo con una limitada capacidad predictiva del 47.9% de acuerdo al coeficiente de determinación de Nagelkerke.

Tabla 41. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general simple

Lesión / Criterio		β	p
Granulomas en corazón / Extensión			0.007
	Grado 1	3.685	0.001
	Grado 2	19.300	0.998
	Grado 3	19.773	0.999
Granulomas en bazo / Extensión			0.138
	Grado 1	2.016	0.019
	Grado 2	19.336	0.998
	Grado 3	20.643	0.999
Degeneración de eritrocitos en bazo / Severidad			0.067
	Grado 1	0.701	0.081
	Grado 2	1.870	0.030
	Grado 3	14.543	0.999
Muerte de leucocitos en bazo / Severidad			0.032
	Grado 1	1.637	0.009
	Grado 2	19.620	0.999
Activación de CMM en intersticio renal / Severidad			0.048
	Grado 1	0.659	0.013
	Grado 2	1.054	0.058
	Grado 3	22.534	>0.999
Hemorragias en branquias / Severidad			0.435
	Grado 1	0.613	0.197
	Grado 2	21.624	0.999
Hipertrofia interlamelar branquial / Severidad			0.009
	Grado 1	-1.402	0.008
	Grado 2	-0.570	0.193
	Grado 3	0.030	0.955
Bacterias cocos en branquias / Grado			0.053
	Grado 1	1.171	0.057
	Grado 2	1.846	0.119
Constante		-0.761	0.074

Significancia del modelo, $p < 0.001$, R^2 de Nagelkerke = 0.479

Las características de cada lesión seleccionada para la creación de este modelo se presentan en la Tabla 42. Allí es posible comparar la distribución de las frecuencias de las alteraciones en los peces positivos y negativos a estrepococosis, así como su frecuencia en la población total. Además, se recuerda la correlación (d de Somers) de la severidad y/o de la extensión de los hallazgos con la enfermedad, se indica también el porcentaje de correlación de la calificación (ausencia, leve, moderada y severa o focal, multifocal y generalizado) del criterio seleccionado (severidad o extensión) de cada alteración con la estrepococosis.

Los granulomas en bazo y corazón son lesiones con frecuencia moderada en la muestra (10-25%) y se presentaron con una frecuencia significativa mayor en los peces positivos. Ambos cambios tienen correlación moderada con el diagnóstico de estreptococosis tanto en sus calificaciones de severidad como de extensión, sin considerar el tipo de muestreo. Hay que destacar que la extensión multifocal o generalizada de estas lesiones tiene un vínculo fuerte con el diagnóstico de estreptococosis, ya que todos los animales analizados en el estudio con esos grados de extensión de granulomas se diagnosticaron como positivos a estreptococosis.

Tabla 42. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general simple: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis (- y +) con el criterio de severidad o extensión

Lesión	Frecuencia (%)			Correlación de la prevalencia de estreptococosis con la calificación (%)				
	Total	-	+	0	1	2	3	dS
Granulomas en corazón (E)	12.7	0.5	27.2	38.2	96.4	100.0	100.0	0.576
Granulomas en bazo (E)	12.7	1.0	26.5	38.5	87.5	100.0	100.0	0.550
Muerte de leucocitos en bazo (S)	8.8	2.1	16.7	41.8	84.6	100.0	-	0.449
Degeneración de eritrocitos en bazo (S)	15.5	9.9	22.2	42.1	54.1	87.5	100.0	0.237
Activación de CMM en intersticio renal (S)	55.1	42.7	69.8	30.8	55.2	72.4	100.0	0.259
Hemorragias en branquias (S)	8.5	5.7	11.7	44.1	56.0	100.0	-	0.195
Hiperplasia interlamelar branquial (S)	91.8	92.7*	90.7*	51.7	31.0	44.8	66.0	0.130
Bacterias cocos en branquias (S)	5.1	2.6	8.0	44.3	66.7	83.3	-	0.277

* Diferencia estadística no significativa; dS: Coeficiente d de Somers; E: Extensión; S: Severidad

El modelo incluye otras dos lesiones localizadas en bazo: muerte de leucocitos y degeneración de eritrocitos, cuyas severidades también tuvieron una frecuencia significativa mayor en animales positivos, aunque la correlación con la prevalencia fue inferior a la que se demostró en el caso de los granulomas; de nuevo no se puede afirmar ni rechazar de manera categórica que estos dos cambios sean debidos o no a *S. agalactiae* puesto que alteraciones similares, por no decir que iguales, pueden ser causadas por otros agentes bacterianos (Rey et al., 2009). Se podrían plantear al menos tres explicaciones: 1) que se trate de una infección por *S. agalactiae* en ambos grupos muestrales, 2) que en el grupo de peces tomados al azar se deban a otro agente patógeno y en el de peces de la muestra dirigida sea *S. agalactiae* el responsable; a favor de esta hipótesis habla el hecho de que la mayor prevalencia y el máximo grado de severidad de ambos cambios sólo se encontró en los peces positivos a estreptococosis, y 3) una situación inversa a la anterior, tal vez la menos probable.

La activación de CMM en intersticio renal fue muy frecuente (55.1%) y aunque hubo diferencias significativas entre tilapias positivas y negativas, el alto porcentaje de individuos del grupo al azar con el cambio no parecen garantizar que su origen sea la presencia de los cocos explicando su baja correlación con la estreptococosis. Mas bien,

según nuestra experiencia con tilapias de diagnóstico, la alteración tendría como origen desordenes en la calidad del alimento.

Las hemorragias en branquias son un hallazgo extraño y por el momento no es prudente adelantar comentario alguno. De otro lado, la hiperplasia interlamelar fue una lesión bastante común en buena parte de las muestras, aunque sin diferencias significativas entre positivos y negativos; también la correlación con la enfermedad fue muy baja y más de la mitad de los peces sin hiperplasia interlamelar branquial fueron diagnosticados como positivos a estreptococosis; este hallazgo explica los coeficientes negativos que se incluyeron en el modelo (Tabla 41), de manera que a mayor severidad de la lesión hay una menor probabilidad de diagnóstico positivo, es decir, la presencia de hiperplasia lamelar en un pez vivo reduciría la probabilidad de que padeciera estreptococosis. Como se comentó en apartados anteriores, este fenómeno podría explicarse por el sesgo de Neyman (Grimes y Schulz, 2002).

Por último, la presencia de bacterias cocoides en branquias fue mayor en peces positivos que en los negativos. Aunque la correlación con la enfermedad es baja y un buen porcentaje de peces sin este hallazgo fue positivo (44.3%), la prevalencia de estreptococosis presenta una correlación con el grado de severidad (Tabla 42). Este es un hallazgo interesante toda vez que nuestra experiencia diagnóstica de rutina no nos había demostrado que la presencia de cocos en las branquias fuera un cambio confiable de la patología.

5.4.1.2. Modelo general avanzado

Para la construcción de este modelo se procedió de igual manera que el modelo general simple, en éste se evaluaron las calificaciones de severidad (ausencia, leve, moderada y severa) y/o extensión (ausente, focal, multifocal y generalizada) de todos los peces seleccionados para el estudio (n=354), así como los incluidos para el estudio de concordancias (n=35), tanto los de la muestra al azar como las del dirigido.

En el modelo inicial para la prueba de regresión logística se incluyeron las lesiones cuyas calificaciones de severidad y/o extensión estaban significativamente correlacionadas con el diagnóstico de enfermedad estreptocócica en ambos tipos de muestreo (n=47) (Tablas 38 y 39 y Anexos 4.1 y 4.2); seleccionándose el criterio severidad o extensión según el coeficiente d de Somers fuera mayor. Se incluyeron también las bacterias cocoides en meninges y bazo correlacionadas con la enfermedad en ambos muestreos (Anexos 5.2.1 y 5.2.2).

La prueba de regresión seleccionó las lesiones que deben ser incluidas, así como el criterio de severidad o extensión (Tabla 43). En este caso se obtuvo un modelo significativo con muy buena capacidad predictiva del 90.7% según el coeficiente de determinación de Nagelkerke.

Tabla 43. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado

Lesión / Criterio		β	p
Epicarditis / Extensión			<0.001
	Grado 1	4.476	<0.001
	Grado 2	21.376	0.997
	Grado 3	19.704	0.996
Miocarditis / Extensión			>0.999
	Grado 1	18.877	0.997
	Grado 2	20.345	0.999
Coroiditis / Severidad			0.003
	Grado 1	1.663	0.009
	Grado 2	2.951	<0.001
	Grado 3	22.411	0.997
Meningitis / Severidad			<0.001
	Grado 1	4.009	<0.001
	Grado 2	22.956	0.997
	Grado 3	19.551	0.996
Granulomas en meninges / Extensión			>0.999
	Grado 1	22.367	0.997
	Grado 2	3.790	>0.999
Constante		-4.463	<0.001

Significancia del modelo, $p < 0.001$, R^2 de Nagelkerke = 0.907

La caracterización de las lesiones puede consultarse en la Tabla 44. Se comparan las frecuencias de los hallazgos en los peces positivos y negativos a estreptococosis, así como su frecuencia en la población total distribuida por tipo de muestreo. También se señala la correlación (d de Somers) de la severidad y/o de la extensión de los hallazgos con la enfermedad, se indica el porcentaje de correlación de la calificación del criterio seleccionado (severidad o extensión) de cada alteración con la estreptococosis.

En esta tabla aparecen tres de las lesiones que en nuestra experiencia y resultados de investigaciones anteriores se deben considerar claves en el diagnóstico de estreptococosis por *S. agalactiae* ST 260, son ellas: epicarditis, coroiditis y meningitis. Tanto la miocarditis como los granulomas en meninges tienen una alta especificidad para la entidad, pero como se ve, se presentan con una frecuencia relativamente baja.

La epicarditis fue una lesión frecuente (38.7% en la población total) y de manera notoria en tilapias que proceden de muestreos dirigidos; aún más, en ambos grupos fue mucho más frecuente en las muestras positivas a la enfermedad. La correlación en aquellas provenientes del muestreo aleatorio fue alta y moderada en aquellas que procedían de uno dirigido. La extensión multifocal o generalizada de este cambio muestra una asociación muy fuerte con al diagnóstico de la estreptococosis dado que el 100% de los peces con estas calificaciones resultaron positivos.

Tabla 44. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis con el criterio de severidad o extensión según tipo de muestreo (Ale: aleatorio; Dir: dirigido)

Lesión	Tipo de muestreo	Frecuencia (%)			Correlación de la prevalencia de estreptococosis con la calificación (%)				
		Total	-	+	0	1	2	3	dS
Epicarditis (E)	Ale	27.5	3.1	71.6	14.0	88.4	100.0	100.0	0.724
	Dir	64.5	9.1	89.2	21.1	89.7	100.0	100.0	0.511
Miocarditis (E)	Ale	2.8	0.0	8.0	33.8	100.0	100.0	-	0.660
	Dir	21.5	0.0	31.1	60.7	100.0	100.0	-	0.373
Coroiditis (S)	Ale	46.2	32.1	71.6	18.8	41.8	68.4	100.0	0.357
	Dir	59.8	12.1	81.1	32.6	81.0	100.0	100.0	0.451
Meningitis (S)	Ale	23.1	2.5	60.2	18.4	88.6	100.0	100.0	0.696
	Dir	63.6	0.0	91.9	15.4	100.0	100.0	100.0	0.562
Granulomas en meninges (E)	Ale	4.5	0.0	12.5	32.6	100.0	100.0	100.0	0.665
	Dir	12.1	0.0	17.6	64.9	100.0	100.0	100.0	0.342

dS: Coeficiente d de Somers; E: Extensión; S: Severidad

En contraste, la frecuencia general de la miocarditis fue baja (8.5%) y solo fue evidente en tilapias positivas a estreptococosis con lesiones focales o multifocales, pero no extensas. No obstante, un buen porcentaje (60.7%) de peces de muestreo dirigido no tuvieron miocarditis a pesar de ser positivos, lo cual explica la baja correlación con la enfermedad de este grupo muestral comparado con el muestreo aleatorio donde la correlación fue alta. No es clara la razón del bajo número de peces afectados por esta alteración, y en principio se podría especular un bajo tropismo del patógeno por el tejido muscular del corazón.

Resulta interesante observar que la coroiditis estuvo presente en todos los animales de los cuatro grupos posibles: los de la muestra aleatoria tanto positivos como en los negativos y en los de la muestra dirigida. En el último caso hay una correlación moderada con la enfermedad, estando presente en todos los casos de forma moderada a severa. No obstante, es llamativa la alta prevalencia de esta lesión en los peces negativos de la muestra al azar (32.1%), lo que explicaría su baja correlación con estreptococosis. Estos resultados podrían deberse a que es una lesión asociada a otras patologías de origen infeccioso.

La meningitis muestra un comportamiento similar a la epicarditis y a la coroiditis en los peces del muestreo dirigido y positivos a la patología. Esta lesión mostró una correlación alta y moderada con la estreptococosis en casos de muestreos aleatorios y dirigidos, respectivamente, indicando tal vez que muchos animales sin signos podrían pasar desapercibidos a pesar de ser positivos a la enfermedad. Hay que destacar que la meningitis en tilapias del muestreo dirigido siempre estuvo asociada con la estreptococosis independientemente del grado de severidad de la lesión.

Finalmente, los granulomas en meninges que son poco frecuentes de manera general, son lesiones sólo reportadas en peces diagnosticados positivos a la enfermedad con cualquier grado de severidad, además de estar correlacionados de forma alta en el muestreo aleatorio, aunque baja en el muestreo dirigido, de forma similar a lo comentado en el caso de la miocarditis.

5.4.1.3. Modelo aleatorio

Para la construcción de este modelo se tomaron en cuenta las calificaciones de severidad o extensión de los 259 peces provenientes del muestreo aleatorio junto con los que hicieron parte del estudio de concordancias.

En la prueba inicial de regresión logística se incluyeron las lesiones cuyas calificaciones de severidad y/o extensión tuvieron correlación significativa con el diagnóstico de enfermedad en el muestreo aleatorio (n=41) (Tablas 38 y Anexo 4.1); se incluyeron las calificaciones cuyo criterio de severidad o extensión fuera mayor según el coeficiente d de Somers. Se incluyeron además las bacterias cocoides en meninges y bazo correlacionadas con la enfermedad que también se asociaron con el muestreo al azar (Anexos 5.2.1 y 5.3).

Las lesiones y su calificación de severidad o extensión seleccionadas finalmente mediante la regresión logística se presentan en la Tabla 45. En este caso se obtuvo también un modelo significativo con muy buena capacidad predictiva del 90.0% según el coeficiente de determinación de Nagelkerke.

Tabla 45. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo aleatorio

Lesión / Criterio		β	p
Endocarditis / Extensión			0.042
	Grado 1	1.254	0.089
	Grado 2	4.511	0.035
Epicarditis / Extensión			<0.001
	Grado 1	5.909	<0.001
	Grado 2	23.111	0.998
	Grado 3	20.812	0.998
Coroiditis / Severidad			0.016
	Grado 1	1.259	0.117
	Grado 2	3.358	0.001
	Grado 3	25.236	0.998
Meningitis / Extensión			<0.001
	Grado 1	5.107	<0.001
	Grado 2	18.059	0.998
	Grado 3	3.202	>0.999

Tabla 45 (cont.). Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo aleatorio

Lesión / Criterio		β	p
Granulomas en meninges / Severidad			>0.999
	Grado 1	24.574	0.999
	Grado 2	-2.299	>0.999
	Grado 3	23.572	0.998
Detritus celulares en la luz branquial / Severidad			0.020
	Grado 1	0.124	0.920
	Grado 2	3.230	0.032
	Grado 3	25.693	0.999
Constante		-6.312	<0.001

Significancia del modelo, $p < 0.001$, R^2 de Nagelkerke=0.900

En la Tabla 46 se encuentran las frecuencias de los hallazgos en los peces positivos y negativos a estreptococosis, así como su frecuencia en la población total de peces de un muestreo aleatorio. Las asociaciones de las lesiones con el diagnóstico de la enfermedad se señalan con la correlación d de Somers del criterio de severidad o de extensión con la enfermedad; se indica el porcentaje de correlación de la calificación (ausencia, leve, moderada y severa o focal, multifocal y generalizada) del criterio seleccionado (severidad o extensión) de cada alteración con la estreptococosis.

Tabla 46. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo aleatorio: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis con el criterio de severidad o extensión

Lesión	Frecuencia (%)			Correlación de la prevalencia de estreptococosis con la calificación (%)					dS
	Total	-	+	0	1	2	3		
Endocarditis (E)	28.3	16.4	50.0	24.9	60.3	85.7	-	0.376	
Epicarditis (E)	27.5	3.1	71.6	14.0	88.4	100.0	100.0	0.724	
Coroiditis (S)	46.2	32.1	71.6	18.8	41.8	68.4	100.0	0.357	
Meningitis (E)	23.1	2.5	60.2	18.4	89.5	100.0	100.0	0.701	
Granulomas en meninges (S)	4.5	0.0	12.5	32.6	100.0	100.0	100.0	0.665	
Detritus celulares en la luz branquial (S)	81.8	81.1*	83.0*	33.3	29.2	55.6	100.0	0.148	

* Diferencia estadísticamente no significativa; dS: Coeficiente d de Somers; E: Extensión; S: Severidad

Al igual que en el modelo anterior, la epicarditis, la coroiditis, la meningitis y los granulomas en meninges permiten identificar animales positivos a estreptococosis a partir de una población tomada al azar sin signos clínicos de la enfermedad; de no ser así, podrían ser tomados como falsos negativos.

Resultado sorprendente la aparición de endocarditis, al igual que la miocarditis en el modelo general avanzado (Tablas 43 y 44). Conforme a la experiencia diagnóstica de nuestro grupo, nos sentimos bastante confiados de que ambas lesiones son causadas

por *S. agalactiae*, aunque las razones biológicas para su escasa predilección por estas dos localizaciones, por el momento, no la conocemos. Si bien se podría especular que las dos alteraciones tienen una buena especificidad para estreptococosis.

Los detritus celulares en la luz branquial al igual que otros hallazgos en este órgano, en nuestra opinión, hacen parte de los hallazgos inespecíficos que caben esperar en peces sometidos a cultivo intenso en aguas de regular a baja calidad. La mayor correlación con estreptococosis a medida que incrementa la severidad de este hallazgo pudiera indicar un deterioro general de las condiciones del agua que favorecen tanto el material extraño como la enfermedad simultáneas.

5.4.1.4. Modelo dirigido

Para la construcción de este modelo se utilizaron las calificaciones de severidad o extensión de 130 peces del muestreo dirigido, se incluyeron también aquellos analizados para el estudio de concordancias.

En la prueba inicial de regresión logística se incluyeron las lesiones cuyas calificaciones de severidad y/o extensión tuvieron correlación significativa con el diagnóstico de enfermedad en el muestreo dirigido (n=37) (Tabla 39 y Anexo 4.2); se incluyeron las calificaciones según el criterio de severidad o extensión conforme el coeficiente d de Somers fuera mayor. Se incluyeron también las bacterias cocoides en meninges y bazo correlacionadas con la enfermedad en el muestreo dirigido (Anexos 5.2.2 y 5.4).

Las lesiones que fueron finalmente seleccionadas mediante la regresión logística se presentan en la Tabla 47. La prueba seleccionó lesiones solo con el criterio de severidad y se obtuvo un modelo significativo con una excelente capacidad predictiva del 98.0% según el coeficiente de determinación de Nagelkerke.

Tabla 47. Lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo dirigido

Lesión / Criterio		β	p
Esplenitis / Severidad			>0.999
	Grado 1	0.245	>0.999
	Grado 2	21.684	0.995
	Grado 3	-0.108	>0.999
Meningitis / Severidad			>0.999
	Grado 1	39.979	0.996
	Grado 2	39.511	0.996
	Grado 3	39.659	0.997
Necrosis en corazón / Severidad			>0.999
	Grado 1	38.148	0.996
	Grado 2	0.538	>0.999
	Grado 3	0.149	>0.999
Constante		-19.892	0.996

Significancia del modelo, $p < 0.001$, R^2 de Nagelkerke=0.980

La Tabla 48 contiene las características de las lesiones con relación a la enfermedad. Se comparan las frecuencias de las alteraciones en los peces positivos y negativos a estreptococosis, así como su frecuencia en la población total de tilapias que proceden de un muestreo dirigido. También se señala la correlación d de Somers del criterio de la severidad de los hallazgos con la enfermedad, se indica el porcentaje de correlación de la calificación (ausencia, leve, moderada y severa o severa o focal, multifocal, generalizado) del criterio seleccionado (severidad o extensión) de cada alteración con la estreptococosis.

Tabla 48. Caracterización de las lesiones seleccionadas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo dirigido: frecuencia de presentación y correlación de la prevalencia de estreptococosis con el criterio de severidad

Lesión	Frecuencia (%)			Correlación de la prevalencia de estreptococosis con la calificación (%)					dS
	Total	-	+	0	1	2	3		
Esplenitis (S)	58.9	33.3	70.3	50.0	60.9	97.0	85.7	0.303	
Meningitis (S)	63.6	0.0	91.9	15.4	100.0	100.0	100.0	0.562	
Necrosis en corazón (S)	55.1	0.0	79.7	31.3	100.0	100.0	100.0	0.501	

* Diferencia estadística no significativa; dS: Coeficiente d de Somers; E: Extensión; S: Severidad

A pesar de la alta frecuencia de la esplenitis en las muestras con diagnóstico positivo a la entidad, no es despreciable el porcentaje de este cambio en peces negativos a ella, también se constata una relativa menor correlación con la enfermedad. Como se mencionó previamente con otras lesiones, en el contexto de un estudio como éste, el hallazgo bien puede ser debido a *S. agalactiae* en ambas poblaciones de peces; aún más, y como sostenemos en otra parte del trabajo (apartado 5.3.4), la especificidad de las lesiones compatibles con estreptococosis también está dada por la cantidad de las mismas en una población acotada como esta. De todas formas, no se puede ignorar que este cambio puede ser ocasionado por otros patógenos.

Los resultados de la meningitis resultan contundentes por sí solos y parecen no ameritar explicación adicional. Ahora bien, la necrosis en corazón, como en su momento la endocarditis y la miocarditis (ver modelos anteriores), resulta altamente sorprendente y es un hallazgo muy significativo de esta investigación. No se observaron en ningún animal negativo y en los positivos cualquier grado de severidad se asoció de manera perfecta con la enfermedad.

5.4.1.5. Resumen de los modelos

En la Tabla 49 se compilan las lesiones seleccionadas en cada uno de los modelos propuestos para el diagnóstico de estreptococosis, así como la recomendación de valorar severidad o extensión de cada lesión de acuerdo con los resultados arrojados por las pruebas de regresión logística.

Se ratifica una vez más, esta vez con herramientas matemáticas, que las lesiones más significativas de estreptococosis son de tipo inflamatorio que pudiéramos definir como subagudas y que se localizan en corazón, encéfalo (con predilección por las meninges), ojo y bazo. Se propone que además de su morfología, las lesiones por *S. agalactiae* ST 260 son subagudas porque, como lo sostenemos en otro estudio (Iregui et al., 2015), este patógeno no produce toxina alguna, sino que la muerte ocurre por acumulo de lesiones en los órganos señalados, de forma similar a como lo hace *Mycobacterium* spp., es decir, las lesiones precisan de un cierto número y tiempo para evolucionar.

Sin embargo, el mayor número de cambios tiene lugar en las branquias que, como se dijo antes, se trata de alteraciones de carácter inespecífico, además de ser indicadores de las condiciones del cultivo no podemos saber en cuanto favorecen o contribuyen a la gravedad de la patología, es algo que amerita estudios adicionales.

Tabla 49. Lesiones incluidas en cada uno de los modelos diagnósticos propuestos

Órgano	Lesión	General simple	General avanzado	Aleatorio	Dirigido
Branquias	Hemorragias	Severidad			
	Hiperplasia interlamelar	Severidad			
	Detritus celulares en la luz			Severidad	
	Bacterias cocos	Severidad			
Ojo	Coroiditis		Severidad	Severidad	
Sistema nervioso	Meningitis		Severidad	Extensión	Severidad
	Granulomas en meninges		Extensión	Severidad	
Riñón	Activación CMM en tej. intersticial	Severidad			
Corazón	Necrosis				Severidad
	Epicarditis		Extensión	Extensión	
	Miocarditis		Extensión		
	Endocarditis			Extensión	
	Granulomas	Extensión			
Bazo	Degeneración de eritrocitos	Severidad			
	Muerte de leucocitos	Severidad			
	Esplenitis				Severidad
	Granulomas	Extensión			

Dada su relevancia en el diagnóstico de la estreptococosis con fines pedagógicos se muestran imágenes histológicas de algunas de las lesiones incluidas en los modelos generados en este trabajo (Figuras 16 a 28).

Desafortunadamente, en el caso de presencia de cocos, activación de CMM en tejido intersticial renal, muerte de leucocitos en el bazo y esplenitis no se incluyen imágenes debido a que estas lesiones no se han observado en las muestras más recientes que disponíamos con el fin de tomar fotografías de buena calidad.

Figura 16. Hemorragias en branquias. 10x

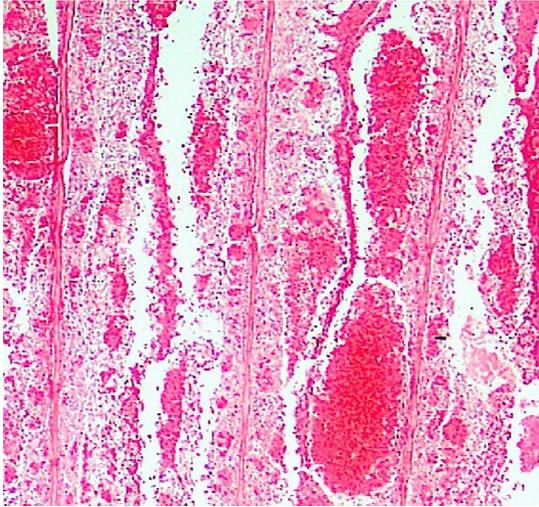


Figura 17. Hiperplasia interlamelar. 10x

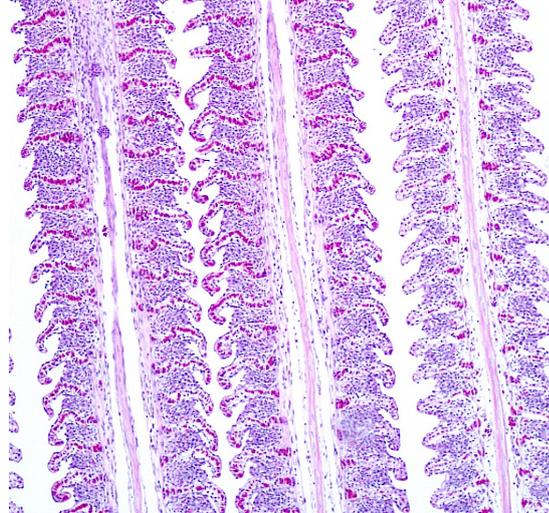


Figura 18. Detritus celulares en la luz branquial y presencia de algunos patógenos. 20x

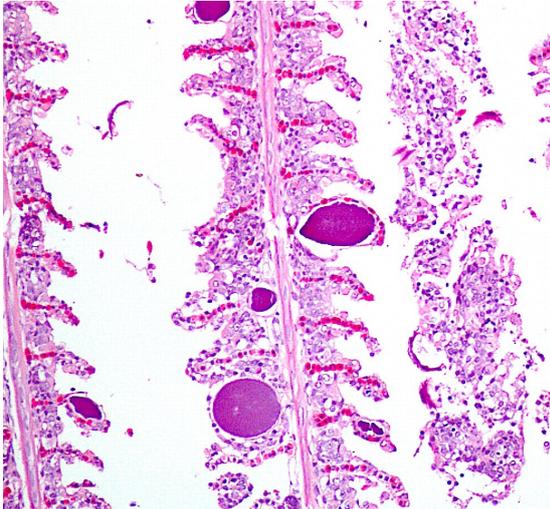


Figura 19. Coroiditis. 40x

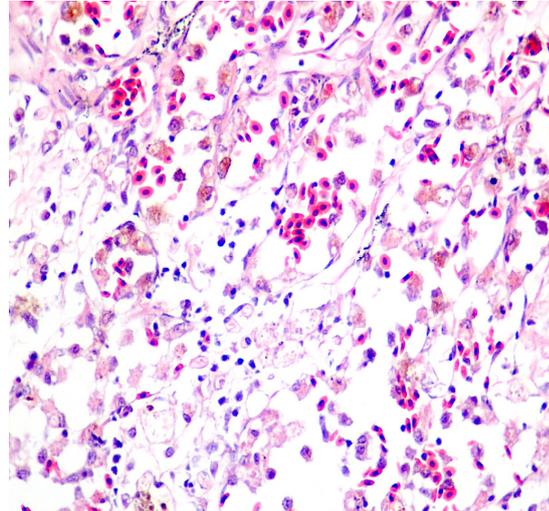


Figura 20. Meningitis. 4x

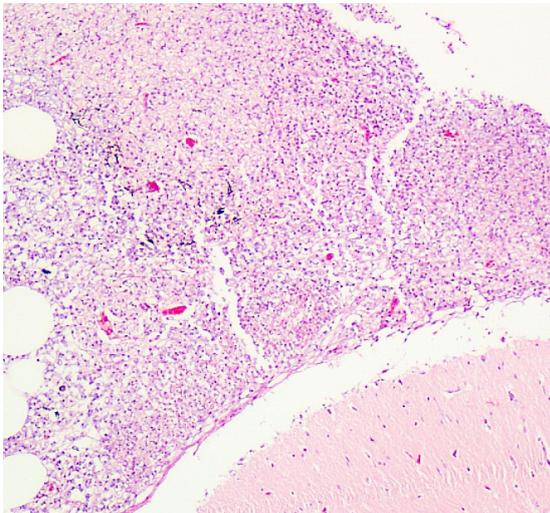


Figura 21. Granulomas en meninges y también en encéfalo. 4x

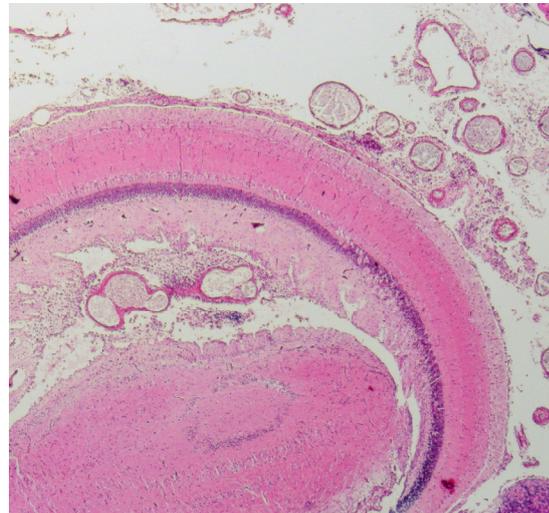


Figura 22. Necrosis en epicardio. 40x

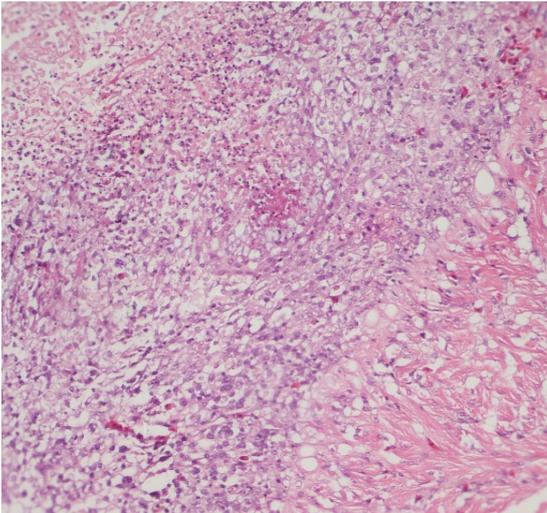


Figura 23. Epicarditis. 4x

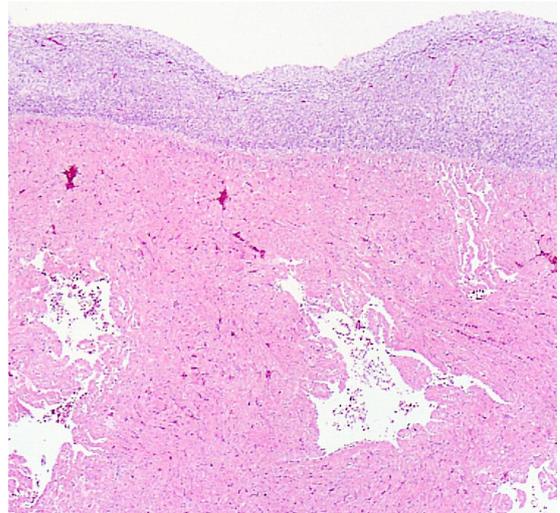


Figura 24. Miocarditis y epicarditis. 4x

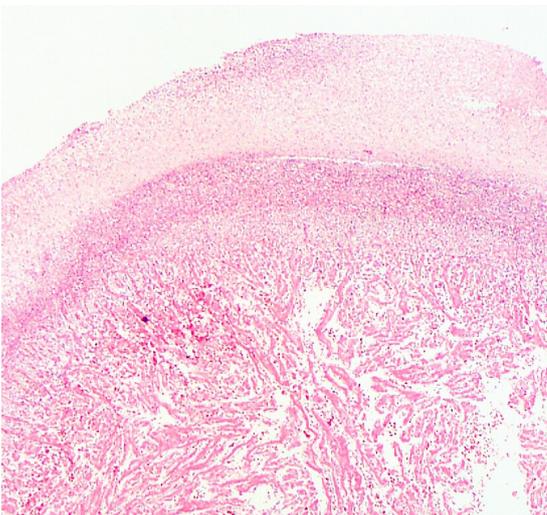


Figura 25. Endocarditis. 20x

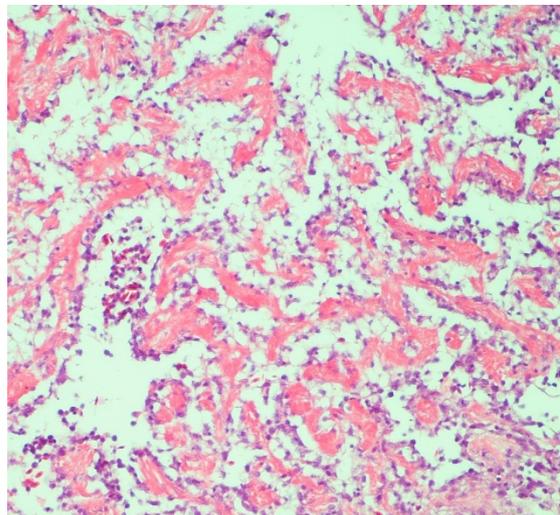


Figura 26. Granulomas en corazón. 4x

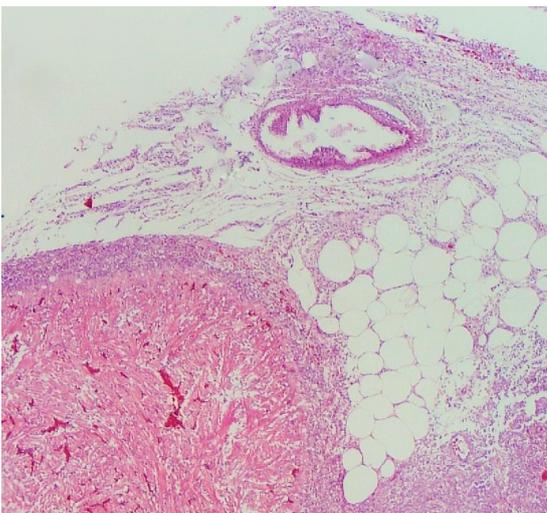


Figura 27. Muerte de leucocitos en bazo. 40x

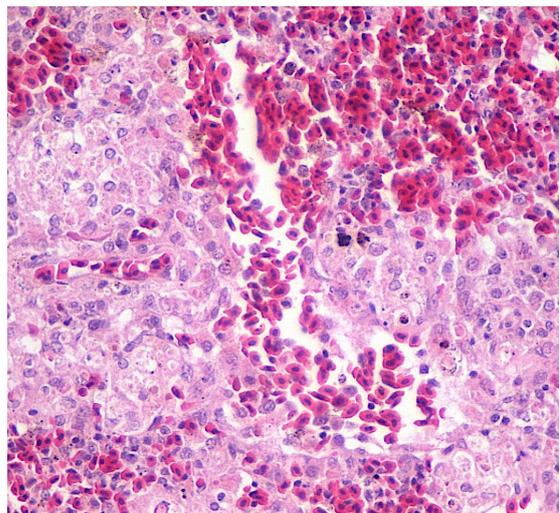
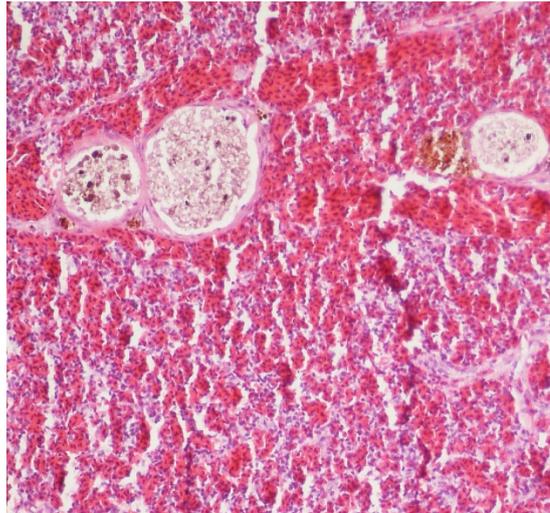


Figura 28. Granulomas en bazo. 20x



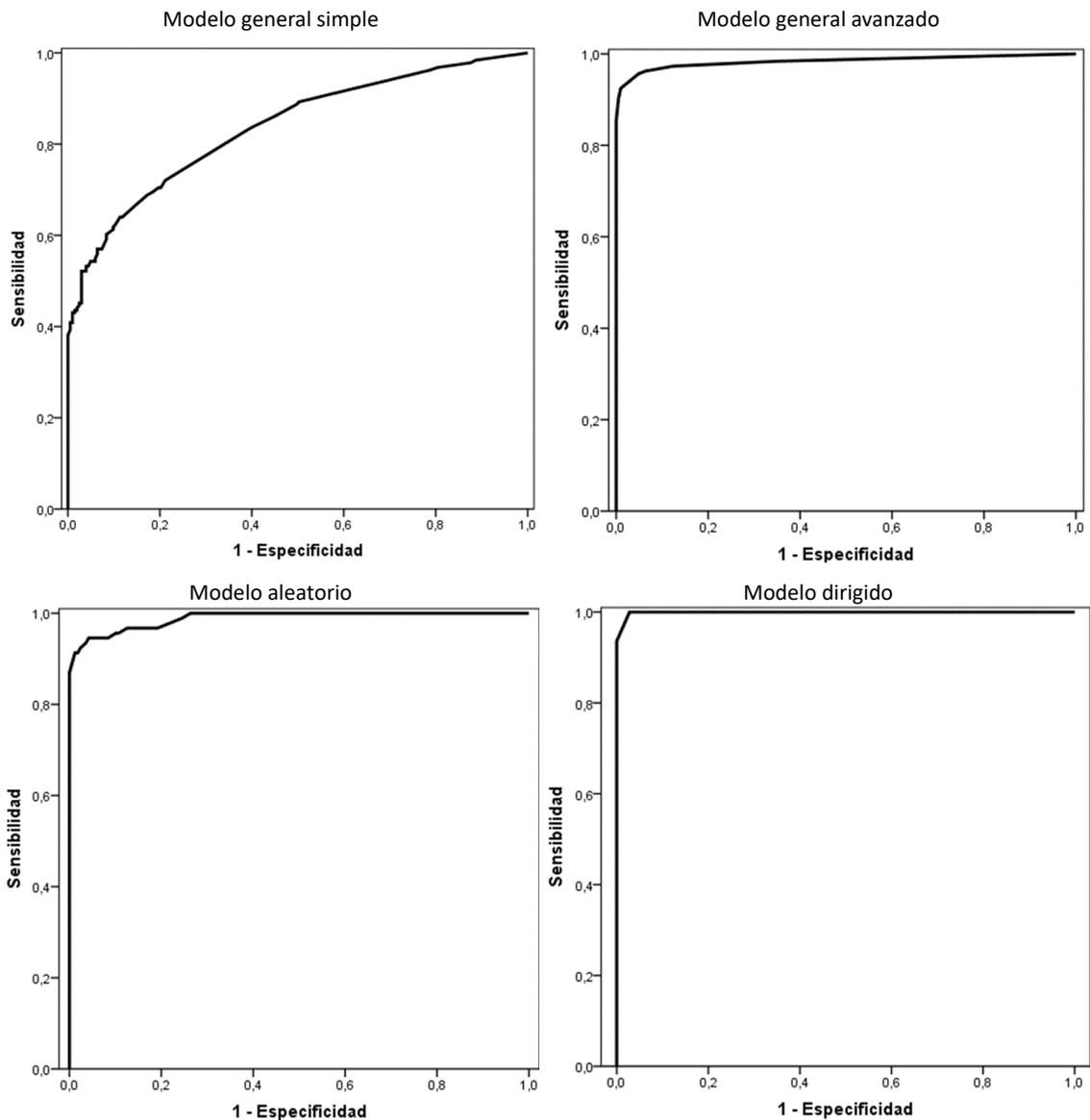
5.4.2. Evaluación de la fiabilidad diagnóstica de los modelos

La fiabilidad de una prueba es la capacidad para distinguir entre dos estados: salud o enfermedad, y se evalúa en función de dos características o criterios: la sensibilidad y la especificidad (Burgueño et al., 1995). En el presente estudio, se optimizó la sensibilidad y la especificidad de cada uno de los modelos mediante el ajuste del punto de corte o valor límite adecuado para cada modelo predictivo propuesto, se buscó maximizar el total de verdaderos positivos y verdaderos negativos en base a las lesiones incluidas en cada modelo.

Sin embargo, dado que la sensibilidad y la especificidad varían en función del valor elegido como punto de corte para clasificar a una tilapia como sana o enferma, se tuvo en cuenta el espectro completo de puntos de corte mediante el uso de curvas ROC (*receiver operating characteristics*, características operativas del receptor) que permiten conocer la calidad de la prueba unificando el proceso de evaluación y uso de las pruebas diagnósticas. La curva ROC es un gráfico en el que se observan todos los pares (sensibilidad, 1- especificidad) resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados (Burgueño et al., 1995). En la Figura 29 se muestran las curvas ROC correspondientes a cada uno de los modelos, de manera que las curvas más próximas a la esquina superior izquierda indican mayor capacidad predictiva global de la prueba.

El área bajo la curva (AUROC) permite la determinación objetiva de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica, y su valor para cada modelo se muestra en la Tabla 50. De manera complementaria en esa misma tabla se indican los puntos de corte seleccionados para los modelos propuestos con el valor de sus respectivas sensibilidades y especificidades. Dependiendo de la aplicación del punto de corte, se consideran como positivos los mayores o iguales (\geq) o los mayores ($>$) a dicho punto; en consecuencia, existen dos posibles interpretaciones diagnósticas: sensible y específica, respectivamente.

Figura 29. Curvas ROC de los cuatro modelos generados por regresión logística



Es decir, planteamos un diagnóstico más sensible cuando consideramos positivos a aquellos peces con un valor de la regresión logística mayor o igual al punto de corte y negativos los que tengan valor menor. El diagnóstico más específico se obtiene al incluir como positivos sólo a los peces con una puntuación en la regresión logística mayor al punto de corte y negativos los que tengan un valor menor o igual.

De acuerdo con estos resultados, el modelo más fiable sería el orientado al diagnóstico de la enfermedad en animales con signos (modelo dirigido), puesto que se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% (con la interpretación sensible), con un AUROC de 0.999. De esta forma existiría una alta certeza a la hora de confirmar o descartar la estreptococosis a partir de animales sospechosos (con signos).

Tabla 50. Áreas bajo la curva (AUROC), puntos de corte para considerar como positivo un resultado, sensibilidad (%) y especificidad (%) de cada uno de los modelos diagnósticos generados

	General simple	General avanzado	Aleatorio	Dirigido
AUROC	0.836 (p<0.001)	0.984 (p<0.001)	0.989 (p<0.001)	0.999 (p<0.001)
Punto de corte	≥ 0.33811	≥ 0.50337	≥ 0.43068	≥ 0.85714
Sensibilidad	83.3 (77.3, 88.0)	95.7 (91.7, 97.8)	93.5 (86.5, 97.0)	100.0 (96.1, 100.0)
Especificidad	61.1 (54.2, 67.5)	95.6 (91.8, 97.7)	97.0 (93.2, 98.7)	100.0 (90.4, 100.0)
Punto de corte	> 0.33811	> 0.50337	> 0.43068	> 0.85714
Sensibilidad	72.0 (65.2, 78.0)	92.5 (87.8, 95.5)	92.4 (84.1, 96.3)	93.6 (86.8, 97.0)
Especificidad	78.8 (72.7, 83.9)	99.0 (96.5, 99.7)	97.6 (94.0, 99.1)	100.0 (90.4, 100.0)

De otra parte, el modelo menos fiable sería aquel donde no se conoce el origen de las muestras (modelo general simple) y a pesar de que con la interpretación sensible la sensibilidad es superior al 80% y su AUROC es de 0.836, la especificidad es bastante inferior (61.1%), lo que le resta confiabilidad a la prueba, es decir, que habría demasiados falsos positivos lo que conllevaría un sobrediagnóstico de la estreptococosis. En este caso sería más adecuada una interpretación específica que resultaría en una sensibilidad del 72.0% y una especificidad del 78.8%.

El modelo general avanzado sería el más recomendable para ser utilizado en un sistema de diagnóstico dado que tiene en cuenta las dos poblaciones de peces, tanto las de una muestra al azar como las de una muestra dirigida; en tanto que el modelo aleatorio sería más recomendable para sistemas de monitoreo de animales en apariencia sanos, donde la posibilidad de detectarlos favorecería la toma de medidas preventivas; en consecuencia este último se consideraría un verdadero modelo predictivo de la enfermedad en vigilancia epidemiológica rutinaria.

Los coeficientes de los modelos no son definitivos, ya que están calculados para un contexto epidemiológico específico, pero son un buen ejemplo del potencial que ofrece esta metodología para ayudar al diagnóstico de enfermedades. La incorporación posterior de nuevos resultados diagnósticos procedentes de otros lugares y momentos permitirían recalcular los modelos de manera que las lesiones incluidas podrían variar, así como sus coeficientes. Este es el fundamento de algunos sistemas expertos basados en análisis continuo de datos masivos. Este tipo de sistemas está iniciando su desarrollo y se espera que herramientas de bioinformática, como *machine learning* y *big data*, cobren una importancia creciente en los próximos años (Ouyang et al., 2019; MacInnes, 2020; Romero et al., 2021).

5.4.3. Validación de los modelos diagnósticos

A partir de los resultados obtenidos en los apartados anteriores se construyó una herramienta en Microsoft Excel 2016 que facilita la utilización de los modelos diagnósticos, la herramienta permitió introducir las calificaciones de muestras adicionales que provenían

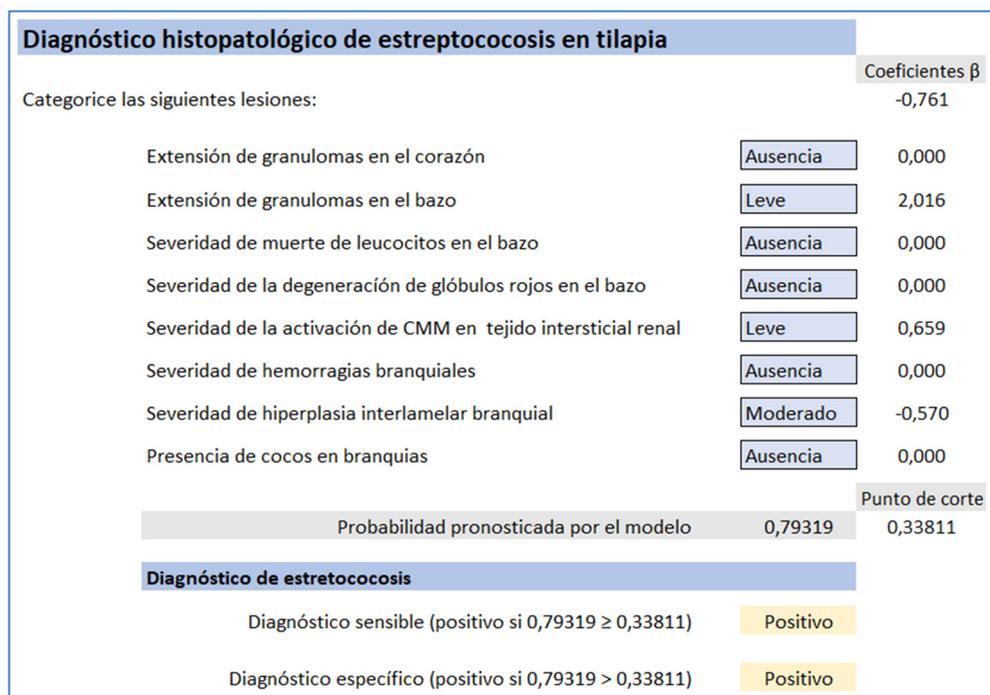
del estudio global (n=5 292) y de esta forma validar los modelos creados.

Para validar los modelos se usaron los resultados de las calificaciones de severidad o extensión de las lesiones, así como el diagnóstico emitido por otros expertos a partir de 100 tilapias escogidas al azar que eran parte de la muestra global; en este caso, la investigadora tampoco conocía el tipo de muestreo, aleatorio o dirigido, al que pertenecían las muestras. Los hallazgos de los 100 individuos se validaron tanto con el modelo general simple como con el modelo general avanzado. Posteriormente se separaron aquellos provenientes del modelo aleatorio (n=78) de los del muestreo dirigido (n=22) para ser validados en los modelos correspondientes.

En la Figuras 30 a 33 se muestra un ejemplo de la implementación de cada uno de los modelos, se pueden ver los coeficientes β (generados en la regresión logística) para cada lesión (severidad o extensión) presente o ausente en el ejemplo respectivo, así como el punto de corte para el modelo y la interpretación del diagnóstico en función de la sensibilidad o la especificidad de acuerdo con la Tabla 50 del apartado anterior.

La Figura 30 ilustra el ejemplo donde, de acuerdo con el modelo general simple (procedencia desconocida del muestreo), el diagnóstico resultó positivo a estreptococosis, en función de la calificación (leve, moderado o severo) de la severidad o extensión de tres lesiones presentes en los tejidos del pez validado.

Figura 30. Herramienta usada para validar el modelo general el cual se aplica a tilapias de las cuales se desconoce el tipo de muestreo: aleatorio o dirigido. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación



En la Figura 31 se muestra un ejemplo del modelo general avanzado en el que se incluyen lesiones que se ha demostrado que están estadísticamente asociadas con la

estreptococosis tanto en el muestreo aleatorio como el dirigido. En este caso el modelo arrojó un diagnóstico final negativo a la enfermedad ya que la probabilidad diagnosticada por la regresión logística fue menor que el punto de corte establecido.

Figura 31. Herramienta para validar el modelo general avanzado el cual se aplica a tilapias que proceden bien sea de muestreos aleatorios o dirigidos. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación

Diagnóstico histopatológico de estreptococosis en tilapia		
Categorice las siguientes lesiones:		Coeficientes β
		-4,463
Extension/Corazón - Epicarditis	Ausencia	0,000
Extension/Corazón - Miocarditis	Ausencia	0,000
Severidad/Ojo - Coroiditis	Moderado	2,951
Extension/Sistema Nervioso - Meninges - Granulomas	Ausencia	0,000
Severidad/Sistema Nervioso - Meninges - Inflamación	Ausencia	0,000
Probabilidad pronosticada por el modelo		Punto de corte
0,18065		0,50337
Diagnóstico de estreptococosis		
Diagnóstico sensible (positivo si $0,18065 \geq 0,50337$)		Negativo
Diagnóstico específico (positivo si $0,18065 > 0,50337$)		Negativo

La Figura 32 corresponde al ejemplo del modelo aleatorio. En este caso la probabilidad diagnosticada por el modelo es igual que el punto de corte, generando un diagnóstico positivo o negativo según la interpretación del punto de corte, de forma que se podría optar por una interpretación sensible asumiendo que el pez es positivo, o una interpretación específica estableciendo un diagnóstico negativo a estreptococosis.

Figura 32. Herramienta para validar el modelo aleatorio; se aplica a tilapias en apariencia sanas que proceden de un muestreo al azar. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación

Diagnóstico histopatológico de estreptococosis en tilapia		
Categorice las siguientes lesiones:		Coeficientes β
		-6,312
Severidad/Ojo-Coroiditis	Ausencia	0,000
Extension/Corazón - Epicarditis	Leve	5,909
Extension/Corazón - Endocarditis	Ausencia	0,000
Severidad/Sistema nervioso Meninges - Granulomas	Ausencia	0,000
Extension/Sistema nervioso Meninges - Inflamación	Ausencia	0,000
Severidad/Branquias-Detritus celulares en la luz	Leve	0,124
Probabilidad pronosticada por el modelo		Punto de corte
0,43068		0,43068
Diagnóstico de estreptococosis		
Diagnóstico sensible (positivo si $0,43068 \geq 0,43068$)		Positivo
Diagnóstico específico (positivo si $0,43068 > 0,43068$)		Negativo

En la Figura 33 se muestra un ejemplo similar al aleatorio, pero en el modelo dirigido. En este caso, aunque la probabilidad diagnosticada es igual que el punto de corte, generando un diagnóstico sensible positivo pero un diagnóstico específico negativo, el punto de corte es muy alto (0.8571) por tanto la interpretación sensible sería más adecuada.

Figura 33. Herramienta para validar el modelo dirigido; se aplica a tilapias con signos, es decir que provienen de un muestreo dirigido. Las calificaciones corresponden a un ejemplo del estudio de validación

Diagnóstico histopatológico de estreptococosis en tilapia		
Categorice las siguientes lesiones:		Coeficientes β -19,892
Severidad/Bazo - Esplenitis	Moderado	21,684
Severidad/Corazón - Necrosis	Ausencia	0,000
Severidad/Sistema Nervioso - Meninges - Inflamación	Ausencia	0,000
Probabilidad pronosticada por el modelo		Punto de corte 0,85714
Diagnóstico de estreptococosis		
Diagnóstico sensible (positivo si $0,85714 \geq 0,85714$)		Positivo
Diagnóstico específico (positivo si $0,85714 > 0,85714$)		Negativo

Al evaluar la sensibilidad y especificidad calculados para los nuevos diagnósticos basados en los modelos, se observa que ambos indicadores de fiabilidad (sensibilidad y especificidad) (Tabla 51) presentan valores menores a los estimados al generar los modelos (Tabla 50). Sin embargo, al comprobar el solapamiento de intervalos de confianza, se puede constatar que las sensibilidades y especificidades (tanto de la interpretación sensible como específica) del modelo general simple serían significativamente menores por lo que este modelo no sería válido, y las lesiones incluidas en éste no serían adecuadas para el diagnóstico de la estreptococosis.

Tabla 51. Peces evaluados para la validación de los modelos, puntos de corte para considerar como positivo un resultado, sensibilidad (%) y especificidad (%) obtenidas

	General simple	General avanzado	Aleatorio	Dirigido
n	100	100	78	22
Punto de corte	≥ 0.33811	≥ 0.50337	≥ 0.43068	≥ 0.85714
Sensibilidad	51.7 (34.4, 68.6)	83.3 (66.4, 92.7)	75.0 (50.5, 89.8)	92.9 (68.5, 98.7)
Especificidad	90.1 (81.0, 95.1)	81.4 (70.8, 88.8)	85.5 (74.7, 92.2)	87.5 (52.9, 97.8)
Punto de corte	> 0.33811	> 0.50337	> 0.43068	> 0.85714
Sensibilidad	48.3 (31.4, 65.6)	83.3 (66.4, 92.7)	75.0 (50.5, 89.8)	92.9 (68.5, 98.7)
Especificidad	97.2 (90.3, 99.2)	94.3 (86.2, 97.8)	93.5 (84.6, 97.5)	87.5 (52.9, 97.8)

En los modelos general avanzado y aleatorio sería válida la interpretación específica de la probabilidad diagnosticada (cuando se consideran positivos a los que presentan una

probabilidad superior al punto de corte establecido), aunque con una sensibilidad y especificidad inferiores a las establecidas inicialmente.

Por último, el modelo dirigido estaría validado para ambas interpretaciones (sensibilidad y especificidad), el cual tuvo buena fiabilidad, aunque menor a la inicialmente establecida al generar el modelo.

Como hemos indicado en el apartado anterior, el modelo puede y debe refinarse introduciendo nueva información, de manera que, al generar otra vez los modelos con nuevos datos, se podrían modificar las variables incluidas, así como los coeficientes, y debería establecerse un nuevo punto de corte para optimizar el diagnóstico. Este fenómeno ocurre de forma natural en el aprendizaje de los especialistas en diagnóstico, que conforme van adquiriendo experiencia incluyen o descartan lesiones como criterios diagnósticos relevantes, así como van cambiando de forma subjetiva la ponderación de dichas lesiones sobre el diagnóstico que emiten.

Aunque esta propuesta parte de la necesidad de un diagnóstico de la manera subjetiva tradicional, la “matematización” de las lesiones que deben ser priorizadas para ese diagnóstico simplifica la tarea de generar información para uso estadístico aun por personas de poca especialización en el área de la histopatología de tilapia. En cierta medida, una parte importante del diagnóstico de estreptococosis se puede objetivar estadísticamente por la metodología desarrollada en este trabajo y no solo depender de la subjetividad del patólogo, lo que permite su utilización en sistemas automatizados.

En consecuencia, los modelos resultantes ofrecen un instrumento que permitiría la utilización de grandes volúmenes de información basada en unas pocas lesiones en poblaciones numerosas de individuos y de esta forma conocer la evolución temporal de esta patología en particular. A nuestro entender, es esta la primera vez que se obtiene una herramienta de esta naturaleza para una enfermedad en peces, y quizás en otras especies animales; más aún, creemos que metodología similar se puede emplear para otras enfermedades de las tilapias y de esta forma implementar sistemas de vigilancia epidemiológica basados en el concepto de lesiones-enfermedad y no solo en el de etiología como es lo usual.

6 Conclusiones

Con base en los resultados de nuestro estudio se llega a las siguientes conclusiones:

PRIMERA. En la primera fase del estudio se constató que la concordancia de las observaciones de la estudiante con respecto al tutor fue apropiada en la mayoría de las lesiones evaluadas en las tilapias seleccionadas. Aun más, aquellas lesiones reportadas por diferentes autores y que fueron confirmadas en este estudio como características de la estreptococosis tuvieron concordancias desde aceptables hasta excelentes, lo que les confiere consistencia a los resultados aquí reportados.

SEGUNDA: Las concordancias no aceptables corresponden en su mayoría a lesiones con frecuencias muy bajas o muy altas, debido a cuatro factores: el tamaño de muestra, la exhaustividad del listado de las lesiones, entre las que se incluyen un alto número de alteraciones inespecíficas y la utilización de un sistema de calificación de la severidad y la extensión de las lesiones con cuatro grados.

TERCERA: Las tilapias procedentes de muestras aleatorias, es decir, en apariencia sanas, presentan una gran variedad de cambios histológicos en sus órganos, algunos con más frecuencia que otros, los cuales se pueden explicar como respuestas bioquímicas, fisiológicas e inespecíficas a diversos factores presentes en el ambiente pero también a patógenos diversos entre los que se incluye *S. agalactiae*; por tanto, la histopatología se confirma como una herramienta adecuada para evaluar el estado de salud, bienestar general y la presencia de múltiples patógenos potenciales y sustancias que de emplear otra técnica menos exhaustiva se pueden pasar por alto; también permite determinar la relevancia de estos hallazgos en poblaciones que provienen de monitoreos de rutina en las granjas.

CUARTA: El diagnóstico de estreptococosis por *S. agalactiae* ST260, determinado con base en los cambios histopatológicos, explica en buena medida la presencia de estos hallazgos en las tilapias de ambos muestreos, pero en especial en aquellas con signos, sin que ello descarte la concurrencia de otros patógenos menos prevalentes o sustancias no determinadas en esta población. Por lo anterior, ratificamos la importancia de esta enfermedad y su alta prevalencia en las tilapias de cultivo en Colombia y la necesidad de continuar con investigaciones que busquen formas adecuadas de control o prevención.

QUINTA: Las elevadas correlaciones entre la severidad y la extensión en la mayoría de las lesiones evaluadas en esta investigación permiten el empleo de cualquiera de estos dos criterios para la gradación de los daños en cualquier órgano. Este hallazgo

aporta claridad a lo que siempre ha sido un dilema para los morfólogos en los estudios de histopatología: cuál de los dos o si ambos criterios son imprescindibles para calificar una lesión.

SEXTA: Este trabajo confirma matemáticamente la solidez y la confiabilidad de las lesiones consideradas como típicas que de manera subjetiva se emplean de rutina en el diagnóstico de estreptococosis por *S. agalactiae* ST260, pero que tal vez no se limiten únicamente a esta secuencia genómica. Asimismo, los análisis permitieron asociar la enfermedad con algunas lesiones infrecuentes y/o no descritas por la literatura, como los cambios en el hepatopáncreas y tejido cardiaco diferentes de epicarditis, que al estar correlacionadas con la entidad merecen seguimiento en futuros estudios; especial atención merecen la necrosis del miocardio, la miocarditis y la endocarditis.

SÉPTIMA: Los cambios inflamatorios y necróticos en encéfalo, corazón y ojo, que son característicos de la enfermedad estreptocócica, tuvieron correlaciones significativas de moderadas a altas con la entidad, tanto en los muestreos aleatorios como en los dirigidos, de tal forma que pudimos notar su potencial para diseñar los modelos de diagnóstico propuestos.

OCTAVA: La presencia de los granulomas en encéfalo, corazón y ojo mostró una alta especificidad para la estreptococosis, aunque su frecuencia fuera baja, y podrían ser un mecanismo de la bacteria para persistir en portadores asintomáticos.

NOVENA: Los modelos predictivos generados seleccionaron aquellas lesiones que tienen asociación directa con la estreptococosis y que se fueron ratificando a medida que se avanzaba en las diferentes fases del estudio.

DÉCIMA: Los modelos propuestos mostraron buenos porcentajes de sensibilidad y especificidad, no obstante que, tras la validación el modelo denominado general simple no mostró resultados aceptables, probablemente debido al tamaño de la muestra validada. Este tipo de modelos ofrecen un elevado potencial para ser perfeccionados y evolucionar como un sistema experto basado en el análisis masivo de datos con el fin de diagnosticar diferentes enfermedades.

UNDÉCIMA: Los modelos propuestos son una herramienta que permitiría el análisis automatizado de un gran número de muestras con fines epidemiológicos, no ya sobre la base de una etiología sino sobre el concepto de lesiones-enfermedad, mucho más amplio, sólido y preciso que el primero; además de facilitar el manejo de ingentes volúmenes de información en programas de vigilancia epidemiológica. Una característica del instrumento desarrollado es la simplificación del diagnóstico de una patología específica, de tal suerte que no sea necesario personal de alta especialización.

7

Referencias bibliográficas

- Abdel-Tawwab M, Hagrass A, Elbaghdady H, Monier M. Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. *Aquaculture International*. 2015; 23: 1261-1274.
- Agnew W, Barnes A. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. 2017; 122(1-2): 1-15.
- Al-Harbi AH. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. *Aquaculture*. 1994; 128: 195-201.
- Alsaid M, Mohd H, Mohamed N, Khairani S, Mohamed Y, Farag A, Hayati R. Pathological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). En: *International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences (CAMS)*. Kuala Lumpur (Malasia): Dec. 29-30. 2013: 70-73. DOI: 10.15242/IICBE.C1213075.
- Amal M, Zamri-Saad M, Zahrah A, Zulkafli A. Water quality influences the presence of *Streptococcus agalactiae* in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Research*. 2015; 46: 313-323.
- Amal, M, Zamri-Saad, M. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 2011; 34(2): 195-206.
- Armwood AR, Camus AC, López-Porras A, Ware C, Griffin MJ, Soto E. Pathologic changes in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) associated with an outbreak of *Edwardsiella anguillarum*. *Journal of Fish Diseases*. 2019; 42: 1463-1469.
- Arthur JR, Ogawa K. A brief overview of disease problems in the culture of marine finfishes in East and Southeast Asia. En: Main KL, Rosenfeld C. (eds). *Aquaculture health management strategies for marine fishes*. Proceedings of a Workshop in Honolulu, Hawaii, Oct 9-13. 1996: 9-31.
- Asche F, Hansen H, Tveteras R, Tveteras S. The salmon disease, crisis in Chile. *Marine Resource Economics*. 2009; 24: 405-411.
- Assefa A, Abunna F. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish Hindawi. *Veterinary Medicine International*. 2018; 5432497; 1-10.
- Assis GB, Tavares GC, Pereira FL, Figueiredo HC, Leal CA. Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed

- Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Fish Diseases*. 2017; 40: 51-63.
- Au DWT. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 2004; 48(9-10): 817-834
- AVMA American Veterinary Medical Association. *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 edition*. Schaumburg, IL, USA. 2013: 67-72.
- Bacharach E, Mishra N, Briese T, Zody MC, Tsofack JEK, Zamostiano R, Berkowitz A, Ng J, Nitido A, Corvelo A, Toussaint NC, Abel Nielsen SC, Hornig M, Del Pozo J, Bloom T, Ferguson H, Eldar A, Lipkin WI. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia. *mBio*. 2016; 7(2): e00431-16.
- Barato P, Martins ER, Melo-Cristino J, Iregui CA, Ramirez M. Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in Colombia over 8 years. *Journal of Fish Diseases*. 2015; 38(12): 1083-1087.
- Bartley DM, Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP. A risk analysis framework for aquatic animal health management in marine stock enhancement programs. *Fisheries Research*. 2006; 80: 28-36.
- Baumann PC, Harshbarger JC. Frequencies of liver neoplasia in a feral fish population and associated carcinogens. *Marine Environmental Research*. 1985; 17(2-4): 324-327.
- Behera BK, Pradhan BK, Swaminathan TR, Sood N, Paria P, Das A, Verma DK, Kumar R, Yadav MK, Dev AK, Parida PK, Das BK, Lal KK, Jena JK. Emergence of Tilapia Lake Virus associated with mortalities of farmed Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. *Aquaculture*. 2018; 484: 168-174.
- Bercovier H, Ghittino C, Eldar A. Immunization with bacterial antigens: infection with streptococci and related organisms. *Development in Biological Standardization*. 1997; 90: 153-160.
- Bernet D, Schimidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 1999; 22: 25-34.
- Berridge BR, Fuller JD, de Azavedo J, Low DE, Bercovier H, Frelief F. Development of a specific nested oligonucleotide PCR primer for *S. iniae* 16s-23s ribosomal DNA intergenic spacer. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 36: 2778-2781.
- Birkbeck TH, Bordevik M, Froystad MK, Baklien A. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of Fish Diseases*. 2007; 30: 505-507.
- Birkbeck TH, Feist SW, Verner-Jeffreys DW. *Francisella* infections in fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases*. 2011; 34: 173-187.
- Bondad-Reantaso M. Tilapia Lake Virus (TiLV) Caused by an Orthomyxo-like virus (Family Orthomyxoviridae) threatening cultured and wild stocks of tilapia. *FAO Aquaculture Newsletter*. 2017; 57: 9-11.

- Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Arthur JR, Ogawa K, Chinabut S, Adlard R, Tan Z, Shariff M. Disease and health management in Asian *Aquaculture*. *Veterinary Parasitology*. 2005; 123(3-4): 249-272.
- Bowser PR, Wooster GA, Getchell RG, Timmons MB. *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. *Journal of World Aquaculture Society*. 1998; 29: 335-339
- Boyd CE. *Water Quality: An Introduction*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts. 2000: 185-192.
- Bragg RR, Broere JSE. Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1986; 6: 89-91.
- Brock JA, Gose R, Lightner DV, Hasson KW. An Overview on Taura Syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. En: Browdy CL, Hopkins JS (eds). *Swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming Aquaculture*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 1995: 84-94
- Brugere C, Onuigbo D, Morgan K. People matter in animal disease surveillance: Challenges and opportunities for the aquaculture sector. *Aquaculture*. 2017; 467: 158-169.
- Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica*. 1995; 104: 661-670.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. *Journal of Parasitology*. 1997; 83(4): 575-583.
- Calderón J, Bayot P, Betancourt I, Alday de Graindorge V. Monitoring study of white spot syndrome in Ecuador. *Abstracts, World Aquaculture Society, Nice, (Spec Publ No. 28)*, 2000.
- Campos G, Alves G, Neto G, Pimenta M, Pacheco J, Pereira HC, Gomes CA. Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (*Leirius marmoratus* x *Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*. *Aquaculture*. 2018; 495: 384-392.
- Ceschia G, Fiorgetti G, Giavenni R, Sarti M. A new problem for Italian trout farms: Streptococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1992; 12: 71-72
- Chen CY, Chao CB, Bowser PR. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-infected tilapia. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 2007; 27: 2-9.
- Chen N, Jiang J, Gao X, Li X, Zhang Y, Liu X, Yang H, Bing X, Zhang X. Histopathological analysis and the immune related gene expression profiles of mandarin fish

- (*Siniperca chuatsi*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2018; 83: 410-415.
- CNA-MADR. *Dirección de cadenas pecuarias, pesqueras y acuícolas. Cadena de la Acuicultura*. 2018. Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/2018-12-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Corbett P, King C, Mondon J. Application of a quantitative histological health index for Antarctic rock cod (*Trematomus bernacchii*) from Davis Station, East Antarctica. *Marine Environmental Research*. 2015; 109: 28-40.
- Corsin F, Turnbull JF, Hao NV, Mohan CV, Phi TT, Phuoc LH, Tinh NTN, Morgan, KL. Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2001; 47(1): 1-12
- Costa FA, Leal CA, Leite RC, Figueiredo HC. Genotyping of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Diseases*. 2014; 37: 463-469.
- Costello MJ. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases*. 2009; 32: 115-118
- Cuéllar-Anjel J. *Síndrome de mortalidad temprana (EMS)-Enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND)*. The Center for Food Security & Public Health. College of Veterinary Medicine. Iowa State university. 2015-0306, 2013
- Darwish AM, Griffin BR. Study shows oxytetracycline controls *Streptococcus* in tilapia. *Global Aquaculture Advocate*. 2002; 5: 34-35.
- Darwish AM, Hobbs MS. Laboratory efficacy of amoxicillin for the control of *S. iniae* infection in blue tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2005; 17: 197-202.
- Davies YM, Xavier MG, Vieira MP, Soares L, Pulecio SL, Zanolli L, de Moura VT, Zanolli MI, Schiavo M, Moreno AM, Saidenberg AB, Marques LR and Knöbla T. *Edwardsiella tarda* outbreak affecting fishes and aquatic birds in Brazil. *Veterinary Quarterly*. 2018; 38(1): 99-105.
- De Muth JE. *Basic statistics and pharmaceutical statistical applications* (3rd edition). CRC Press, 2014: 838 pp.
- de Vos L. *Tilapia (Coptodon) zillii*. *FishBase*, 1999. Disponible en URL: <https://www.fishbase.org/photos/PicturesSummary.php?StartRow=1&ID=1390&what=species&To Rec=9>
- Del Pozo J, Mishra N, Kabuusu R, Cheetham S, Eldar A, Bacharach E, Lipkin WI, Ferguson HW. Syncytial hepatitis of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is associated with Orthomyxovirus-like virions in hepatocytes. *Veterinary Pathology*. 2017; 54(1): 164-170.
- Del Valls TA, Blasco J, Sarasquete MC, Forja JM, Gomez-Parra A. Evaluation of heavy

- metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1998; 41: 157-167.
- Delamare-Deboutteville J, Bowater R, Condon K, Reynolds A, Fisk A, Aviles F, Barnes AC. Infection and pathology in Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), caused by exposure to *Streptococcus agalactiae* via different routes. *Journal of Fish Diseases*. 2015;38(12): 1021-1035
- Delannoy C, Crumlish M, Fontaine M, Pollock J, Foster G, Dagleish M, Zadoks R. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiology*. 2013; 13-41.
- Dewey C. The use of epidemiology to enhance production animal research. *Preventive Veterinary Medicine*. 2008; 86: 244-249.
- Di Cicco E, Ferguson HW, Schulze AD, Kaukinen KH, Li S, Vanderstichel R, Wessel O, Rimstad E, Gardner IA, Hammell KL, Miller KM. Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) disease diagnosed on a British Columbia salmon farm through a longitudinal farm study. *PLoS ONE*. 2017; 12(2): e0171471.
- Di Cicco, Ferguson HW, Schulze A, Kaukinen KH, Li S, Vanderstichel R, Wessel O, Rimstad E, Gardner I, Hammell K, Miller K. Heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) disease diagnosed on a British Columbia salmon farm through a longitudinal farm study. *PLoS ONE*. 2017; 12: 1-31.
- Doménech A, Fernández-Garaizabal JF, Pascual C, García JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD, Domínguez L. Streptococcosis in cultured turbot associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases*. 1996; 19: 33-38.
- Doménech A, Prieta J, Fernández-Garaizabal JF, Collins MD, Jones D, Domínguez L. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiology*. 1993; 9: 63-68.
- Dong HT, Siriroobb S, Meemettab W, Santimanawongb W, Gangnonngiwb W, Pirarat N, Khunraea P, Rattanarojponga T, Vanichviriyakit R, Senapin S. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture*. 2017; 476: 111-118.
- Dong T, Senapin S, Jeamkunakorn C, Nguyen V, Nguyen N, Rodkhum C, Khunrae P, Rattanarojpong T. Natural occurrence of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in farmed hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Southeast Asia. *Aquaculture*. 2019; 499: 17-23.
- Edwards M, Nizet V. Group B Streptococcal Infections, chapter 12. En: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA (eds). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7th ed. Elsevier Inc. 2011: 419-446.

- Eissa A, Moustafa M, Abdelaziz M, Ezzeldeen N. *Yersinia ruckeri* infection in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at a semi-intensive fish farm in lower Egypt. *African Journal of Aquatic Science*. 2008; 33(3): 283-286.
- Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, Horovitz A, Bercovier H. Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish. *Veterinary Microbiology*. 1995; 43: 33-40.
- Eldar A, Ghittino C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1999; 36: 227-231.
- Eldar A, Horovitz, A, Bercovier H. Development of a vaccine against *S. iniae* infection in farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1997; 56: 175-183.
- El-Greisy Z, Elgamal A, Ahmed N. Effects of prolonged ammonia toxicity on fertilized eggs, hatchability and size of newly hatched larvae of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2016; 42: 215-222.
- El-Sayed A.-F.M. *Tilapia Culture* (1st ed.), CABI Publishing. 2006: 277 p.
- El-Sayed A.-F.M. *Tilapia Culture* (2nd ed.), Academic Press. 2020: 358 pp.
- Evans JJ, Klesius PH, Gilbert PM, Shoemaker CA, Al-Sarawi MA, Landsberg J, Durendez R, Al Marzouk A, Al-Zenki S. Characterization of β -hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream *Sparus auratus* and mullet *Liza klunzingeri*, in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*. 2002; 25: 505-513.
- Evans JJ, Pasnik DJ, Klesius PH, Shoemaker CA. Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis* spp. *International Symposium on tilapia in Aquaculture 7*, American Tilapia Association. Charles Town, WV, USA. 2006: 25-42.
- Evans JJ, Klesius PH, Shoemaker CA. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine*. 2004; 22: 3769-2373.
- FAO. *Fishery and Aquaculture Statistics Aquaculture production Yearbook, 2017*. 2019: 253 pp.
- FAO. 2013. *Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304)*. FAO, Rome, Italia 2013: 54 pp
- FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. La sostenibilidad en acción*. Roma. 2020: 243 pp. Disponible en: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229es>
- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. 2018: 250 pp.

- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges*. Rome. 2014: 223 pp.
- Figueiredo HC, Nobrega, Leal CA, Pereira U, Mian G. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012; 43(2): 576-580.
- Filho C, Muller E, Pretto-Giordano L, Bracarense A. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2009; 2: 12-15.
- Fitzsimmons K, Watanabe W. Tilapia (familia Cichlidae). En: Le Francois N, Jobling M, Carter C, Blier P (Eds). *Finfish Aquaculture Diversification*. CAB International, USA. 2010: 704 pp.
- Froese R, Pauly D. *Fishbase*. World Wide Web electronic Publication. Version 06/2018. Disponible en: <http://www.fishbase.org>
- Georgiadis MP, Gardner IA, Hedrick RP. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001; 48(4): 287-302.
- Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathological scoring in research. *Veterinary Pathology*. 2013; 50(6): 1-9.
- Godoy M, Kibenge M, Wang Y, Suarez R, Leiva C, Vallejos F, Kibenge F. First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (P, RV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV. *Virology Journal*. 2016; 13: 98.
- Golani D. *Sarotherodon galilaeus*. *FishBase*. 2013. Disponible en URL: <https://www.fishbase.in/photos/PicturesSummary.php?StartRow=2&ID=1389&what=species&otRec=9>
- Grimes DA, Schulz KF. Bias and causal associations in observational research. *Lancet*. 2002; 359: 248-252.
- Handy RD, Runnalls T, Russell PM. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology*. 2002;11(6): 467-479
- Hedrick RP. Relationships of the host, pathogen, and environment: Implications for diseases of cultured and wild fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1998;10(2): 107-111.
- Hernández E, Figueroa J, Iregui C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *Journal of Fish Diseases*. 2009; 32(3): 247-252.
- Hoshina T, Sano T, Morimoto Y. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of Tokio*

- University of Fisheries*. 1958; 44: 57-58.
- Hsieh CY, Tung MC, Tu C, Chang CD, Tsai SS. Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*. 2006; 254: 129-138.
- Huicab-Pech ZG, Landeros-Sánchez C, Castañeda-Chávez MR, Lango-Reynoso F, López-Collado CJ, Platas Rosado DE. Current State of Bacteria Pathogenicity and their Relationship with Host and Environment in Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Aquaculture Research Development*. 2016; 7: 428.
- Hussain M. Farming of Tilapia: Breeding plans, mass seed production and Aquaculture techniques. *Bangladesh Fisheries Research Institute*. 2004: 149 pp
- Inglis V, Roberts RJ, Bromage N. *Bacterial disease of fish*. London: Blackwell Science Ltd. 1993: 336 pp.
- Iregui C, Barato P, Rey A, Vasquez G, Verjan N. Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and Streptococcosis in tilapia fish. En: *Epidemiology: Theory, Research and Practice Edition* (1st ed.). iConcept Press Ltd. Hong Kong. 2014: 251-276.
- Iregui C, Guarín M, Tibatá V, Ferguson HW. Novel brain lesions caused by *Edwardsiella tarda* in a red tilapia (*Oreochromis* spp.) *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2012; 24(2): 446-449.
- Iregui C, Rey A, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Muniesa A. *Health management in Tilapia production*. Grupo Asis Biomedica (ed). Zaragoza, España. 2019: 92 pp.
- Iregui CA, Comas J, Vásquez GM, Verjan N. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of Fish Diseases*. 2015; 39: 205-215.
- Iregui CA, Hernández E, Jiménez AP, Pulido EA, Rey AL, Comas J, Peña LC, Rodríguez M. *Primer mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia (Ed). Bogotá DC, Colombia. 2004: 49 pp.
- Jansen M, Dong HT, Mohan CV. Tilapia lake virus: a threat to the global tilapia industry? *Reviews in Aquaculture*. 2019; 11: 725-739.
- Jiménez A, Tibatá V, Junca H, Ariza F, Verjan N, Iregui C. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue. *Aquaculture*. 2011; 321: 203-206.
- Jiménez AP, Rey AL, Penagos LG, Ariza MF, Figueroa J, Iregui CA. *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2007; 54: 285-294.
- Jiménez AP, Rey AL, Penagos LG, Ariza MF, Figueroa J, Iregui CA. Estado actual de la

- estreptococosis en tilapias cultivadas en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2007a; 54: 120-123.
- Kayansamruaj P, Dong HT, Nguyen VV, Le HD, Pirarat N, Rodkhum C. Susceptibility of freshwater rearing Asian seabass (*Lates calcarifer*) to pathogenic *Streptococcus iniae*. *Aquaculture Research*. 2017; 48: 711-718.
- Kim YG, Lee KK. Isolation, characterization and pathogenicity of a *Streptococcus* strain in the flounder (*Paralichthys olivaceus*) cultured in Korea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1994; 14: 8-11.
- Kitao T. Streptococcal infection. En: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR (eds). *Bacterial diseases of fish*. Blackwell Scientific Publication, Oxford. 1993: 196-210.
- Klesius P, Shoemaker C, Evans J. *Streptococcus*: A worldwide fish health problem. 8th *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, Cairo. 2008: 83-107.
- Koehler A. The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquatic Toxicology*. 2004; 70: 257-276.
- Kohler A. Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) caught at differently polluted estuaries. *Aquatic Toxicology*. 1990; 15: 271-294.
- Kusuda R, Salati F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual Review of Fish Diseases*. 1993; 3: 69-85.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: 159-174.
- Li L, Wang R, Liang W, Huang T, Huang Y, Luo F, Lei A, Chen M, Gan X. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage in vitro. *Fish and Shellfish Immunology*. 2015; 45: 955-963.
- Liao PC, Tsai YL, Chen YC, Wang PC, Liu SC, Chen SC. Analysis of streptococcal infection and correlation with climatic factors in cultured tilapia *Oreochromis* spp. in Taiwan. *Applied Sciences*. 2020; 10: 4018.
- Lilley JH, Callinan RB, Chinabut S, Kanchanakhan S, MacRae IH, Phillips MJ. *Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook*. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand. 1998.
- Lim C, Webster C. *Tilapia, biology, culture and nutrition*. Food Products Press. New York, Unites States. 2006: 704 pp.
- Liu L, Li, YW, He RZ, Xiao XX, Zhang X, Su YL, Wang, J, Li AX. Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China. *Journal of Fish Diseases*. 2014; 37: 1067-1072.

- Luna L. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (3rd ed). McGraw-Hill, New York. 1968: 258 pp.
- Machimbirike V, Jansen M, Senapin S, Khunrae P, Rattanarojpong T, Dong HT. Viral infections in tilapines: More than just tilapia lake virus. *Aquaculture*. 2019; 503: 508-518.
- MacInnes J. 'Big Data' in animal health research - opportunities and challenges. *Animal Health Research Reviews*. 2020; 21(1): 1-2.
- MADR- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. *Reporte: producción primaria*. Grupo de Información y Estadísticas Sectoriales-GIES de la Oficina Asesora de Planeación y Prospectiva- OAPP. Colombia. 2017. Disponible en: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=64>
- Marine Harvest's. *2016 Annual Report. Noruega*. 2017: 64-66. Disponible en: <http://hugin.info/209/R/2094101/791700.pdf>
- Martin SW, Meek AH, Willeberg P. *Veterinary epidemiology*. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 1987: 343pp
- McClure CA, Hammell KL, Dohoo IR, Nerette P, Hawkins LJ. Assessment of infectious salmon anaemia virus prevalence for different groups of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in New Brunswick. *Journal of Fish Diseases*. 2004; 27: 375-383.
- Merino MC, Bonilla SP, Bages F. *Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia. Plan Nacional de Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia*. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. 2013;160 pp.
- Miyazaki T, Kaige N. 1958. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathology*. 1985; 20(2-3): 219-227
- Mohan CV, Corsin F, Thakur PC, Padiyar PA, Madhusudan M, Turnbull JF, Hao NV, Morgan KL. Usefulness of dead shrimp specimens in studying the epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV) and chronic bacterial infection. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2002; 50(1): 1-8.
- Morgan KL. Epizootic ulcerative syndrome: an epidemiological approach. En: Rodgers CJ (ed). *International Conference on Risk Analysis in Aquatic Animal Health*, Feb 08-10. Office International des Epizooties. Paris. 2001; 209-214.
- National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards. *Red tilapia. Thai Agricultural Standard TAS 7001-2013*. The Royal Gazette, Announcement and General. 2013: 130: 8. Disponible en URL: <https://www.acfs.go.th/standard/download/eng/tilapia.pdf>
- Nguyen HT, Kanai K, Yoshikoshi K. Ecological investigation of *S. iniae* isolated in cultured Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* using selective isolation procedure.

- Aquaculture*. 2002; 205: 7-17.
- Nguyen HT, Kanai K. Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. *Journal of Applied Microbiology*. 1999;86: 769-776.
- Nguyen V, Dong HT, Senapin S, Pirarat N, Rodkhum C. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Thailand. *Aquaculture Research*. 2016; 47: 3697-3702.
- Nicholson P, Fathi MA, Fisher A, Mohan C, Schieck E, Mishra N, Heinemann A, Frey J, Wieland B, Jores J. Detection of Tilapia Lake Virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015. *Journal of Fish Diseases*. 2017; 40: 1925-1928.
- Nieto JM, Devesa S, Quiroga A, Toranzo AE. Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot. *Journal of Fish Diseases*. 1995; 18: 21-30.
- Nowak B, Lukas C. Diagnosis of structural changes in fish gills- can biopsy replace necropsy? *Aquaculture*. 1997; 159: 1-10.
- Nylund A, Ottem KF, Watanabe K, Karlsbakk E, Krossoy B. *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Archives of Microbiology*. 2006; 185: 383-392.
- Oh WT, Jun JW, Kim HJ, Giri SS, Yun S, Kim SG, Kim SW, Kang JW, Han SJ, Kwon J, Park SC. Characterization and pathological analysis of a virulent *Edwardsiella anguillarum* strain isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Korea. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020; 7: 14.
- Oidtmann B, Peeler E, Lyngstad T, Brun E, Jensen BB, Stark KDC. Risk-based methods for fish and terrestrial animal disease surveillance. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013; 112(1-2): 13-26.
- OIE. *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases* (3rd ed.). Office International des Epizooties, Paris. 2000: 240 pp.
- Olsen AB, Mikalsen J, Rode M, Alfjorden A, Hoel E, Straum-Lie K, Haldorsen R, Colquhoun DJ. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *Journal of Fish Diseases*. 2006; 29: 307-311.
- Ortega C, Garcia I, Irgang R, Fajardo R, Tapia-Cammas D, Acosta J, Avendaño-Herrera A. First identification and characterization of *Streptococcus iniae* obtained from tilapia (*Oreochromis aureus*) farmed in Mexico. *Journal of Fish Diseases*. 2018; 41: 773-782.
- Ortega C, Muzquiz JL. Vigilancia epidemiológica y medicina preventiva en acuicultura: Principios generales. *I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2002*;

148-162.

- Ortega Y, Barreiro F, Bueno H, Huancaré K, Ostos H, Manchego A, Araguaí M, Gómez W, de Andrade M, Sandoval N. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports*. 2016; 4: 74-79.
- Osman K, Al-Maary K, Mubarak A, Dawoud T, Moussa I, Ibrahim M, Hessain A, Orabi A, Fawzy N. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *Veterinary Research*. 2017; 13: 357.
- Ottem KF, Nylund A, Isaksen TE, Karlsbakk E, Bergh O. Occurrence of *Francisella piscicida* in farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in Norway. *Journal of Fish Diseases*. 2008; 31: 525-534.
- Ouyang Z, Sargeant J, Thomas A, Wycherley K, Ma R, Esmailbeigi R, Versluis A, Stacey D, Stone E, Poljak Z, Bernardo T. A scoping review of 'big data', 'informatics', and 'bioinformatics' in the animal health and veterinary medical literature. *Animal Health Research Reviews*. 2019; 20(1): 1-18.
- Owatari MS, Fernandes G, Cardoso L, Breda N, Laterca M, Pedreira JL. Can histology and haematology explain inapparent *Streptococcus agalactiae* infections and asymptomatic mortalities on Nile tilapia farms? *Research in Veterinary Science*. 2020; 129: 13-20.
- Palacios G, Lovoll M, Tengs T, Hornig M, Hutchison S, Hui J, Kongtorp RT, Savji N, Bussetti AV, Solovyov A, Kristoffersen AB, Celone C, Street C, Trifonov V, Hirschberg DL, Rabadan R, Egholm M, Rimstad E, Lipkin WI. Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel Reovirus. *PLoS ONE*. 2010; 5(7): e11487
- Peeler E, Taylor N. The application of epidemiology in aquatic animal health - opportunities and challenges. *Veterinary Research*. 2011; 42: 1-94.
- Perera RP, Johnson SK, Lewis DH. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture*. 1997; 152(1-4): 25-33.
- Pillay T. *Aquaculture principles and practices*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, UK. 1993: 600 pp.
- Piñeros R, Griffin M, Montufar M, Yun S, Soto E, Barato P. Immunohistochemistry to characterize outbreaks of *Edwardsiella anguillarum* associated edwardsiellosis in farmed tilapia (*Oreochromis sp.*) in Colombia. *LAQUA 18 Latin American & Caribbean Aquaculture 18*. Bogotá, Colombia. 2018: 319.
- Prihartini N, Yanuhar U, Maftuch. Betanodavirus Infections in Tilapia seed (*Oreochromis*

- sp.), in Indonesia. *Journal of Life Science and Biomedicine*. 2015; 5(4): 106-109.
- Pulido A, Iregui C, Figueroa J, Klesius P. Estreptococosis en Tilapias (*Oreochromis* sp.) cultivadas en Colombia. *Revista AquaTIC*. 2004; 20. Disponible en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=170>
- Pulido EA, Iregui CA. Hibridación *in situ* para la detección de *Streptococcus agalactiae* en tejidos de tilapia (*Oreochromis* sp.). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2010; 57: 11-22.
- Rahimi-Kia E, Mehrabi Y. Detection and identification of different *Streptococcus* strains in farmed rainbow trout in Boyerahmad and Dena regions (North South of Iran). *World Journal of Fish and Marine Science*. 2013; 5: 315-321.
- Rajendran KV, Shivam S, Praveena PE, Sahaya JJ, Kumar TS, Avunje S, Jagadeesan V, Babu P, Pande A, Krishnan A, Alavandi SV, Vijayan KK. Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture*. 2016; 454: 272-280.
- Raskovic B, Jaric I, Koko V, Spasic M, Dulic Z, Markovic Z, Poleksic V. Histopathological indicators: a useful fish health monitoring tool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) culture. *Central European Journal of Biology*. 2013; 8: 975-985.
- Rey AL, Iregui CA, Verján N. Diagnóstico clínico patológico de brotes de enfermedades en tilapia roja (*Oreochromis* spp.). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2002; 49: 13-21
- Rey A, Verján N, Ferguson HW, Iregui C. Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. *Veterinary Record*. 2009; 164: 493-499.
- Rey AL, Vásquez GM, Jiménez, AP, Iregui CA. 2014. Epidemiology of the streptococcosis by *Streptococcus agalactiae* in tilapias (*Oreochromis* sp) cultured in Colombia. *International Symposium Streptococci and streptococcal diseases*, XIX Lancefield. Book of Abstracts 0277 Buenos Aires Argentina. 2014: 235.
- Riba I, Blasco J, Jiménez-Tenorio N, de Canales MLG, Del Valls TA. Heavy metal bioavailability and effects: II. Histopathology-bioaccumulation relationships caused by mining activities in the Gulf of Cadiz (SW, Spain). *Chemosphere*. 2005; 58(5): 671-682.
- Riba I, Casado-Martínez MC, Blasco J, Del Valls TA. Bioavailability of heavy metals bound to sediments affected by a mining spill using *Solea senegalensis* and *Scrobicularia plana*. *Marine Environmental Research*. 2004; 58(2-5): 395-399.
- Roberts RJ, McKnight IJ. The pathology of infectious pancreatic necrosis virus. II. Stress-mediated recurrence. *British Veterinary Journal*. 1976; 132: 209-213.
- Rodger HD, S J McCleary, M Ruane. Clinical cardiomyopathy syndrome in Atlantic

- salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 2014; 37(10): 935-939.
- Rodkhum C, Kayansamruaj P, Pirarat N. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* Serotype Ia Infection in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2011; 41(3): 309-314.
- Romero MP, Chang YM, Brunton LA, Prosser A, Upton P, Rees E, Tearne O, Arnold M, Stevens K, Drewe J. A comparison of the value of two machine learning predictive models to support bovine tuberculosis disease control in England. *Preventive Veterinary Medicine*. 2021; 188: 105264.
- Rosenlund RD. Infectious pancreatic necrosis virus at the Willow Beach National Fish Hatchery, Nevada, in rainbow trout stocked into adjacent Lake Mohave. *Fish Health News*. 1977; 6: 10-13.
- Saleh H, Sabry N, Abd Al-Razik M, Mohamed F, Ibrahim M. Pathogenicity and characterization of Streptococcosis in Egyptian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Kafr Elshikh Governorate. *Alexandria Veterinary Medical Journal*. 2017; 52(1): 173-180.
- Saraiva A, Costa J, Serrao J, Cruz C, Eiras, J. A histology-based fish health assessment of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*. 2015; 448: 375-381.
- Schwaiger J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 2001; 8: 231-240.
- Shoemaker C, Klesius P. Streptococcal disease problems and control: a review. En: Fitzsimmons K (ed). *Tilapia Aquaculture*. Vol. 2. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY. 1997: 671-682.
- Shoemaker CA, Evans JJ, Klesius PH. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American Journal of Veterinary Research*. 2001; 62: 174-177.
- Skjelstad HR, Borno G, Flesja K, Hansen H, Nilsen H, Wasmuth MA, Hjeltne B. *The health situation in farmed fish in Norway 2007*. National Veterinary Institute. Norway. 2007: 20 pp.
- Soto E, Griffin M, Arauz M, Riofrio A, Martínez A, Cabrejos, E. *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2012; 24: 81-90.
- Soto E, Hawke JP, Fernandez D, Morales JA. *Francisella* sp., emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of Fish Diseases*. 2009; 32: 713-722.
- Soto E, Shanin K, Talhami J, Griffin M, Adams A, Ramirez-Paredes G. Characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* farmed in Lake Yojoa, Honduras. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2019; 133:

141-145.

- Steckert LD, Cardoso L, Tomas G, Benites de Páduac S, Laterca M. Investigation of farmed Nile tilapia health through histopathology. *Aquaculture*. 2018; 486: 161-169.
- Stentiford GD, Longshaw M, Lyons, BP, Jones, G, Green M, Feist SW. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*. 2003; 55: 137-159.
- Stern S. Swimming through troubled waters in shrimp farming: Ecuador country review. En: Browdy CL, Hopkins JS (eds). *Swimming Through Troubled Water. Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture`95*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge. 1995: 35-39.
- Su Y, Feng J, Liu, C, Li W, Xie Y, Li A. Dynamic bacterial colonization and microscopic lesions in multiple organs of tilapia infected with low and high pathogenic *Streptococcus agalactiae* strains. *Aquaculture*. 2017; 471,190: 203.
- Subasinghe RP, Bondad-Reantaso MG, McGladdery SE. Aquaculture development, health and wealth. En: Subasinghe RP, Bueno P, Phillips MJ, Hough C, McGladdery SE, Arthur JE (eds). *Aquaculture in the Third Millennium. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium*, Bangkok, Thailand. 20-25 February 2000. NACA, Bangkok and FAO, Rome. 2001; 471 pp.
- Subasinghe RP. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through Aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine*. 2005; 65: 117-124.
- Subramaniam K, Gotesman M, Smith CE, Steckler NK, Kelley KL, Groff JM, Waltzek TB. Megalocytovirus infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2016; 119: 253-258.
- Sugiyama A, Kusuda R. Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased fishes. *Fish Pathology*. 1981; 16: 35-41.
- Suresh A. Tilapia culture in saline waters: a review. *Aquaculture*. 1992; 106: 201-226.
- Suresh A. Ultimos avances en el manejo de reproductores de tilapia. *Revista AquaTIC* 2000; 10. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/90/79>
- Tan Z, Komar C, Enright WJ. Health management practices for cage aquaculture in Asia - a key component for sustainability. *Book of Abstracts, 2nd International Symposium on Cage Aquaculture in Asia*, 3-8 July 2006, Hangzhou. China. 2006
- Taylor G. *Health assessment of tilapia (Oreochromis spp.) aquaculture systems in the northern provinces of South Africa*. Dissertation (MSc). University of Pretoria, 2019.
- Teh SJ, Adams SM, Hinton DE. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish

- populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*. 1997; 37(1): 51-70.
- Thompson WD, Walter SD. A reappraisal of the kappa coefficient. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1988; 41(10): 949-958.
- Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology* (2nd ed). Blackwell Science Ltd. Oxford. 1995.
- Torres J, Muñoz J, Cárdenas H, Alvarez L, Palacio J. Caracterización de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) con marcadores moleculares RAPD. *Acta Agronómica*. 2010; 59: 236-246.
- Tran-Duy A, van Dam A, Schrama J. 2012. Feed intake, growth and metabolism of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in relation to dissolved oxygen concentration. *Aquaculture Research*. 2012; 43: 730-744.
- Trewaves E. *Tilapia fishes of the Genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia*. Natural History Museum Library. London. 1983: 604 pp.
- Triebskorn R, Telcean I, Casper H, Farkas A, Sandu C, Stan G, Colarescu O, Dori T, Kohler HR. Monitoring pollution in River Mures, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2008;141: 177-188.
- Tveteras R, Nystoyl R, Jory D. GOAL 2019: Global finfish production review and forecast. *Global Aquaculture Alliance*. 2019. Disponible en: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/goal-2019-global-finfish-production-review-and-forecast/>
- Ueberschaer B. *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *FishBase*. 1999. Disponible en URL: <https://www.fishbase.in/photos/PicturesSummary.php?StartRow=3&ID=2&what=species&Totec=21>
- Van Dyk JC, Marchand MJ, Smit, NJ, Pieterse GM. A histology-based fish health assessment of four commercially and ecologically important species from the Okavango Delta panhandle, Botswana. *African Journal of Aquatic Sciences*. 2009; 34: 273-282.
- Van Dyk JC, Pieterse GM, Van Vuren JHJ. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007; 66: 432-440.
- Vásquez G, Barato P, Iregui C. Morphological characterization of the adherence and invasion of *Streptococcus agalactiae* to the intestinal mucosa of tilapia *Oreochromis* sp.: An in vitro model. *Journal of Fish Diseases*. 2019; 42(9): 1223-1231.
- Vásquez G, Rey A, Rivera C, Iregui C, Orozco J. Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017; 87: 453-458.
- Vaz Rodrigues M, Falcone-Dias MF, Francisco CJ, David GM, Silva RJ, Araújo Júnior JP.

- Occurrence of *Edwardsiella tarda* in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* from Brazilian Aquaculture *Edwardsiella tarda* in Nile Tilapia. *Acta Scientific Microbiology*. 2019; 2(1): 13-19.
- Vet H. Observer Reliability and Agreement. *StatsRef: Statistics Reference Online*. Wiley. 2014 Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118445112.stat04910>
- Vinatea, L. *Principios químicos de calidad del agua en acuicultura: una revisión para peces y camarones*. UAM, Unidad Xochimilco, México, D.F. 2002: 156 pp.
- Wester PW, Van Der Ven LTM, Vethaak AD, Grinwis GCM, Vos JG. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2002; 11: 289-295.
- Wilson EB. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association*. 1927; 22(158): 209-212.
- Wolf JC, Baumgartner WA, Blazer VS, Camus AC, Engelhardt JA, Fournie JW, Frasca S, Groman DB, Kent ML, Khoo LH, Law KM, Lombardini ED, Ruehl-Fehlert C, Segner HE, Smith SA, Spitsbergen JM, Weber K, Wolfe M. Nonlesions, Misdiagnoses, missed diagnoses and other interpretive Challenges in fish histopathology studies: A Guide for investigators, authors, reviewers and readers. *Toxicologic Pathology*. 2015; 43: 297-325.
- World Bank Group. *Reducing disease risk in Aquaculture*. World Bank report number 88257-GLB. Agriculture and environmental services discussion paper 09. USA. 2014. DOI: 10.13140/RG.2.1.4525.5529
- Xie S, Zheng K, Chen j, Zhang Z, Zhu X, Yang Y. Effect of water temperature on energy budget of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*. 2011; 17: 683-690.
- Yanong R, Francis-Floyd R. *Streptococcal infections of fish*. Report from University of Florida. Series from the Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Review in 2019. 2002: 5 pp. Disponible en: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/FA057>
- Yoshida T, Endo M, Sakai M, Inglis V. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1997; 29: 233-235.
- Yoshida T, Yamada Y, Sakai M, Inglis V, Xie XJ, Chen SC, Kruger R. Association of the cell capsule with antiopsonophagocytosis in β -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1996; 8: 223-228.
- Zamri-Saad M, Amal MN, Siti-Zahrah A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Comparative*

Pathology. 2010;143, 227-229.

Zamri-Saad M, Amal MNA, Siti-Zahrah A, Zulkafli AR. Control and prevention of streptococcosis in cultured tilapia in Malaysia: a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 2014; 37: 389-410.

Zhou K, Cui TT, Li PL, Liang NJ, Liu SC, Ma CW, Peng ZH. Modelling and predicting the effect of temperature, water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 105, 1956-1965.

Zimmerli S, Bernet D, Burkhardt-Holm P, Schmidt-Posthaus H, Vonlanthen P, Wahli T, Segner H. Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquatic Science*. 2007; 69: 11-25.

Anexos

Anexo 1. Frecuencias de lesiones y patógenos y concordancias entre dos evaluadores de una muestra preliminar (n=35)

Anexo 1.A. Lesiones por órganos y sistemas

Tabla 1.A.1. Frecuencia de lesiones en órganos y tejidos, y concordancias entre dos evaluadores

Órgano o tejido	Lesión	Frecuencia según evaluador		Concordancia		
		A	B	Presencia de lesión	Grado de severidad	Grado de extensión
Branquias	Activación células calciformes en branquias	2.3%	4.3%	0.1947	-0.0068	0.1414
	Arcobranquitis/Branquiespinitis	8.3%	5.1%	0.3594	0.5796	0.4813
	Atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales	8.9%	7.1%	0.4878	0.3185	0.3992
	Branquitis	9.7%	8.0%	0.2105	0.3171	0.0907
	Degeneración del cartílago branquial	0.0%	0.6%	-	-	-
	Desprendimiento filamentos branquiales	0.0%	0.9%	-	-	-
	Detritus celulares en la luz branquial	7.4%	6.3%	-0.0448	0.4690	0.3889
	Granulomas en branquias	0.0%	0.0%	-	-	-
	Hemorragias en branquias	1.7%	1.1%	0.5364	0.4560	0.3508
	Hiperplasia células calciformes en branquiespinas	1.1%	4.0%	0.1892	0.3836	0.4361
	Hiperplasia interlamelar branquial	4.9%	8.3%	0.1026	0.0565	0.1374
	Necrosis en branquias	2.3%	6.0%	0.2268	0.3812	0.2135
Ojo	Coroiditis	6.3%	5.7%	0.7627	0.7009	0.7482
	Endoftalmitis	0.9%	0.3%	-0.0448	-0.0479	-0.0515
	Exoftalmitis	2.3%	2.0%	0.9153	0.9139	0.8882
	Granulomas en ojo	2.0%	2.3%	0.7458	0.7222	0.5892
	Granulomas con centro activo en ojo	0.3%	0.3%	1.0000	1.0000	1.0000
	Necrosis en ojo	1.4%	2.0%	0.2000	0.3723	0.3860
	Panoftalmitis	0.9%	0.9%	1.0000	0.9505	1.0000
Sistema nervioso	Meningitis	6.0%	6.0%	0.6429	0.8961	0.8364
	Granulomas en meninges	2.0%	2.0%	1.0000	0.9109	0.9652
	Necrosis en meninges	2.0%	3.4%	0.6479	0.7860	0.7838
	Granulomas con centro activo en meninges	0.0%	0.0%	-	-	-
	Ventriculitis	4.9%	2.9%	0.4793	0.6332	0.5285
	Granulomas en encéfalo	1.4%	0.9%	0.7200	0.7583	0.5313
	Necrosis en encéfalo	1.4%	1.7%	0.4615	0.5827	0.5205
	Encefalitis	0.6%	1.1%	0.2784	0.1489	0.1695
	Granulomas con centro activo en encéfalo	0.0%	0.0%	-	-	-

Tabla 1.A.1 (cont). Frecuencia de lesiones en órganos y tejidos. y concordancias entre dos evaluadores

Órgano o tejido	Lesión	Frecuencia según evaluador		Concordancia		
		A	B	Presencia de lesión	Grado de severidad	Grado de extensión
Riñón	Activación de CMM en intersticio renal	4.6%	6.0%	0.2697	0.2391	0.1954
	Degeneración vacuolar en túbulos renales	0.0%	3.7%	-	-	-
	Glomerulitis	0.3%	0.6%	-0.0396	-0.0396	-0.0396
	Gotas hialinas en túbulos renales	4.6%	5.1%	0.4300	0.7805	0.6348
	Granulomas en intersticio renal	2.3%	2.0%	0.5763	0.8066	0.7039
	Granulomas en túbulos renales	0.0%	0.0%	-	-	-
	Granulomas con centro activo en intersticio renal	0.3%	0.3%	1.0000	1.0000	1.0000
	Hemorragias en intersticio de riñón	0.0%	0.0%	-	-	-
	Necrosis/muerte de túbulos renales	7.4%	2.9%	0.1486	0.1247	0.0870
	Nefritis intersticial perivascular	9.4%	8.3%	0.4531	0.6091	0.5914
	Nefrocalcinosis en túbulos renales	0.6%	0.9%	0.3558	0.8489	0.7091
	Paso de Leucocitos en túbulos renales	0.0%	0.9%	-	-	-
Corazón	Endocarditis	4.3%	2.0%	0.5000	0.6780	0.3675
	Epicarditis	6.9%	5.7%	0.7586	0.8970	0.6798
	Granulomas en corazón	2.0%	2.3%	0.9153	0.8713	0.8353
	Granulomas con centro activo en corazón	0.3%	0.3%	1.0000	0.9210	0.7953
	Hipertrofia del endocardio	0.0%	0.3%	-	-	-
	Miocarditis	0.9%	0.6%	0.7853	0.7218	0.7853
	Necrosis en corazón	1.1%	2.0%	0.4681	0.6847	0.7321
Estómago	Alteraciones glandulares en mucosa gástrica	1.1%	0.9%	0.2081	0.0721	0.0779
	Degeneración hialina en muscular gástrica	0.0%	0.3%	-	-	-
	Detritus celulares en la luz gástrica	0.6%	3.1%	0.2336	0.2336	0.2336
	Granulomas en mucosa gástrica	0.0%	0.0%	-	-	-
	Granulomas en muscular gástrica	0.3%	0.3%	1.0000	1.0000	1.0000
	Granulomas en submucosa gástrica	0.3%	0.3%	1.0000	1.0000	1.0000
	Inflamación en mucosa gástrica	6.9%	5.4%	0.1147	0.2204	0.0102
	Inflamación muscular gástrica	0.3%	0.6%	-0.0396	-0.0338	-0.0396
	Inflamación submucosa gástrica	7.4%	6.9%	0.4422	0.7991	0.6509
	Necrosis/muerte en epitelio de mucosa gástrica	4.9%	4.9%	0.0850	0.0680	0.1148
	Necrosis/muerte en muscular gástrica	0.6%	0.3%	0.6535	0.8108	0.3137
	Necrosis/muerte en submucosa gástrica	0.0%	1.4%	-	-	-
Ulceraciones en mucosa gástrica	0.9%	0.0%	-	-	-	
Intestino	Activación células caliciformes en mucosa intestinal	0.6%	5.4%	0.0971	0.3588	0.2491
	Alteración arquitectura pliegues intestinales	6.3%	4.3%	0.1732	0.3498	0.2806
	Degeneración hialina en muscular intestinal	0.0%	0.9%	-	-	-
	Detritus celulares en la luz intestinal	2.6%	4.9%	0.4205	0.4140	0.5444
	Granulomas en submucosa intestinal	0.6%	0.9%	0.7853	0.7123	0.7853
	Granulomas con centro activo en submucosa intestinal	0.0%	0.0%	-	-	-
	Inflamación en mucosa intestinal	5.1%	3.1%	0.1519	0.3866	0.1741
	Inflamación en muscular intestinal	0.3%	0.6%	-0.0396	-0.0396	-0.0396
	Inflamación en submucosa intestinal	3.1%	4.3%	0.3966	0.5699	0.5257
	Liberación de moco en la luz intestinal	0.3%	5.1%	0.0541	0.1958	0.2553
	Material eosinofílico (proteína) en la luz intestinal	5.4%	1.4%	0.2462	0.3260	0.3158
	Migración leucocitos en mucosa intestinal	0.0%	4.6%	-	-	-
	Necrosis/muerte en mucosa intestinal	2.3%	3.4%	0.4488	0.4958	0.2811
	Necrosis/muerte en muscular intestinal	0.9%	0.0%	-	-	-
	Necrosis/muerte en submucosa intestinal	0.0%	1.4%	-	-	-
Ulceraciones en mucosa intestinal	0.3%	0.0%	-	-	-	

Tabla 1.A.1 (cont). Frecuencia de lesiones en órganos y tejidos. y concordancias entre dos evaluadores

Órgano o tejido	Lesión	Frecuencia según evaluador		Concordancia		
		A	B	Presencia de lesión	Grado de severidad	Grado de extensión
Hígado	Activación de CMM en hígado	1.7%	2.6%	0.4125	0.4125	0.4125
	Alteraciones nucleares en hepatocitos	0.0%	0.6%	-	-	-
	Gotas hialinas en hepatocitos	0.6%	1.7%	0.4531	0.5098	0.4531
	Degeneración vacuolar en hepatocitos	3.4%	4.6%	0.7651	0.8765	0.7676
	Granulomas en hígado	0.6%	0.6%	1.0000	1.0000	1.0000
	Granulomas con centro activo en hígado	0.3%	0.3%	1.0000	1.0000	1.0000
	Hemorragias en hígado	0.3%	0.3%	1.0000	1.0000	1.0000
	Hepatitis	5.1%	3.7%	0.4895	0.4571	0.4037
	Necrosis/muerte en hígado	1.1%	2.9%	0.3171	0.5509	0.5319
	Pigmentos intracelulares en hepatocitos	0.0%	0.6%	-	-	-
Hepato-páncreas	Activación de CMM en hepatopáncreas	2.9%	1.4%	0.2588	0.2588	0.2588
	Granulomas en hepatopáncreas	0.0%	0.3%	-	-	-
	Hemorragias en hepatopáncreas	0.3%	0.0%	-	-	-
	Hepatopancreatitis	6.9%	3.4%	0.2836	0.4869	0.4869
	Necrosis en hepatopáncreas	0.3%	1.1%	0.3713	0.4316	0.7388
Peritoneo/Páncreas	Activación de CMM en Peritoneo/Páncreas	0.0%	0.3%	-	-	-
	Granulomas Peritoneo/Páncreas	0.3%	0.3%	-0.0294	-0.0294	-0.0294
	Granulomas con centro activo en Peritoneo/Páncreas	0.3%	0.3%	1.0000	1.0000	1.0000
	Hemorragias en Peritoneo/ Páncreas	0.0%	0.3%	-	-	-
	Necrosis en Peritoneo/Páncreas	0.6%	1.1%	0.2784	0.4190	0.3377
	Peritonitis/ Pancreatitis peritoneal	3.7%	2.3%	0.2694	0.6474	0.5529
Bazo	Activación de CMM en bazo	8.3%	6.6%	0.4239	0.5172	0.2755
	Degeneración eritrocitos en bazo	0.0%	2.0%	-	-	-
	Depleción de linfocitos en bazo	8.0%	6.0%	0.2857	0.3469	0.3488
	Esplenitis	2.0%	4.0%	0.5455	0.6416	0.5793
	Granulomas en bazo	0.6%	0.6%	-0.0606	-0.0355	-0.0479
	Granulomas con centro activo en bazo	0.3%	0.3%	1.0000	0.9210	1.0000
	Muerte de leucocitos en bazo	0.0%	0.3%	-	-	-
	Necrosis en bazo	0.6%	2.3%	0.3396	0.3059	0.2683

Anexo 1.B. Agentes patógenos por órganos y sistemas

Tabla 1.B.1. Frecuencia de patógenos en órganos y tejidos. y concordancias entre dos evaluadores

Órgano o tejido	Lesión	Frecuencia según evaluador		Concordancia (k)	
		A	B	Presencia de lesión	Grado de infección
Branquias	Bacterias bacilos en branquias	0.0%	0.3%	-	-
	Bacterias cocos en branquias	2.3%	1.7%	0.6447	0.3966
	<i>Epitheliocystis</i> en branquias	6.0%	4.6%	0.6067	0.8246
	<i>Ichthyophthirius</i> en branquias	0.0%	0.0%	-	-
	<i>Microsporidium</i> en branquias	0.0%	0.3%	-	-
	Mixosporidios en branquias	2.3%	2.6%	0.7672	0.7672
	<i>Piscinoodinium</i> en branquias	0.6%	0.3%	0.6535	0.6535
	Trematodos digeneos en branquias	0.0%	0.9%	-	-
	Monogeneos en branquias	5.4%	5.1%	0.5990	0.6667
	<i>Trichodinas-Chilodonellas</i> en branquias	6.9%	6.6%	0.6765	0.6529
Ojo	Bacterias cocos en ojo	1.1%	1.1%	1.0000	0.8256
Sistema Nervioso	Bacterias cocos en meninges	1.7%	1.4%	0.8923	0.9265
	Bacterias cocos en encéfalo	0.9%	0.6%	0.7853	0.9030
Riñón	Bacterias cocos en riñón	0.9%	1.1%	0.8416	0.9559
Corazón	Bacterias cocos en corazón	2.3%	2.0%	0.7458	0.8270
Estómago	Bacterias bacilos en estómago	0.0%	0.0%	-	-
	Bacterias cocos en estómago	0.6%	0.3%	0.6535	0.6535
	Bacterias cocos submucosa en estómago	0.9%	0.6%	0.7853	0.7853
	Parásitos en estómago	0.3%	0.0%	-	-
	Parásitos en submucosa de estómago	0.0%	0.3%	-	-
Intestino	Bacterias bacilos en intestino	0.3%	0.0%	-	-
	Bacterias coco-bacilos en intestino	0.0%	0.0%	-	-
	Bacterias cocos en intestino	2.9%	1.1%	0.3171	0.2934
	Bacterias cocos en muscular intestino	0.0%	0.3%	-	-
	Parásitos en intestino	0.0%	0.0%	-	-
Hígado	Bacterias cocos en hígado	1.1%	1.4%	0.6182	0.7740
	Parásitos en hígado	0.0%	0.0%	-	-
Peritoneo/Páncreas	Bacterias cocos en Peritoneo/Páncreas	1.1%	1.1%	0.4355	0.6133
Bazo	Bacterias cocos en bazo	1.1%	2.0%	0.6809	0.5882

Anexo 2. Correlaciones entre severidad y extensión de las lesiones evaluadas en los diferentes órganos y tejidos

Las lesiones sometidas a la prueba d de Somers fueron aquellas con una frecuencia de presentación por encima del 5% (n=69) al igual que los agentes patógenos (n=10).

Anexo 2.A. Lesiones branquiales

Tabla 2.A.1. Asociación de la severidad y la extensión de la activación de células calciformes branquiales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	28.3%	47.4%	21.5%	2.8%	0.006 ^{x2}	0.662 ^{dS} (p=0.001)
	Dirigido	25.2%	33.6%	39.3%	1.9%		
	Total	27.4%	43.2%	26.8%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	28.3%	27.1%	30.4%	14.2%	0.105 ^{x2}	
	Dirigido	25.2%	23.4%	43.0%	8.4%		
	Total	27.4%	26.0%	34.2%	12.4%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.2. Asociación de la severidad y la extensión de la atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	34.8%	14.2%	33.2%	17.8%	0.001 ^{x2}	0.811 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	56.1%	8.4%	27.1%	8.4%		
	Total	41.2%	12.4%	31.4%	15.0%		
Extensión	Aleatorio	34.8%	43.3%	21.9%	-	0.001 ^{x2}	
	Dirigido	56.1%	31.8%	12.1%	-		
	Total	41.2%	39.8%	18.9%	-		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.3. Asociación de la severidad y la extensión de la degeneración del cartílago branquial con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	93.5%	6.1%	0.4%	-	0.340 ^{RV}	0.993 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	96.3%	2.8%	0.9%	-		
	Total	94.4%	5.1%	0.6%	-		
Extensión	Aleatorio	93.5%	6.1%	0.4%	-	0.082 ^{RV}	
	Dirigido	96.3%	1.9%	1.9%	-		
	Total	94.4%	4.8%	0.8%	-		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.4. Asociación de la severidad y la extensión de desprendimiento de filamentos branquiales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	90.3%	4.5%	5.3%	-	0.001 ^{RV}	0.981 ^{dS} (p=0.001)
	Dirigido	99.1%	0.9%	-	-		
	Total	92.9%	3.4%	3.7%	-		
Extensión	Aleatorio	90.3%	5.7%	4.0%	-	0.002 ^{RV}	
	Dirigido	99.1%	0.9%	-	-		
	Total	92.9%	4.2%	2.8%	-		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.5. Asociación de la severidad y la extensión de detritus celulares en la luz branquial con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	18.2%	62.3%	18.2%	1.2%	0.001 ^{x2}	0.697 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	29.9%	37.4%	28.0%	4.7%		
	Total	21.8%	54.8%	21.2%	2.3%		
Extensión	Aleatorio	18.2%	50.6%	30.0%	1.2%	0.011 ^{RV}	
	Dirigido	29.9%	32.7%	36.4%	0.9%		
	Total	21.8%	45.2%	31.9%	1.1%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.6. Asociación de la severidad y la extensión de hemorragias branquiales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	91.9%	6.9%	1.2%	-	0.876 ^{RV}	0.990 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	90.7%	7.5%	1.9%	-		
	Total	91.5%	7.1%	1.4%	-		
Extensión	Aleatorio	91.9%	7.7%	0.4%	-	0.818 ^{RV}	
	Dirigido	90.7%	8.4%	0.9%	-		
	Total	91.5%	7.9%	0.6%	-		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.7. Asociación de la severidad y la extensión de hiperplasia de células calciformes en branquiespinas con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	46.2%	27.9%	17.0%	8.9%	0.983 ^{x2}	0.869 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	45.8%	27.1%	18.7%	8.4%		
	Total	46.0%	27.7%	17.5%	8.8%		
Extensión	Aleatorio	46.2%	18.2%	27.5%	8.1%	0.986 ^{x2}	
	Dirigido	45.8%	19.6%	26.2%	8.4%		
	Total	46.0%	18.6%	27.1%	8.2%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.8. Asociación de la severidad y la extensión de hiperplasia interlamelar branquial con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	6.1%	21.5%	57.9%	14.6%	0.136 ^{x2}	0.206 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	13.1%	16.8%	54.2%	15.9%		
	Total	8.2%	20.1%	56.8%	15.0%		
Extensión	Aleatorio	6.1%	27.1%	48.6%	18.2%	0.165 ^{x2}	
	Dirigido	13.1%	26.2%	45.8%	15.0%		
	Total	8.2%	26.8%	47.7%	17.2%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.9. Asociación de la severidad y la extensión de branquitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	11.7%	46.2%	36.0%	6.1%	0.017 ^{x2}	0.456 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	15.0%	28.0%	49.5%	7.5%		
	Total	12.7%	40.7%	40.1%	6.5%		
Extensión	Aleatorio	11.7%	35.2%	44.1%	8.9%	0.503 ^{x2}	
	Dirigido	15.9%	28.0%	45.8%	10.3%		
	Total	13.0%	33.1%	44.6%	9.3%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.10. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis branquial con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	39.7%	43.7%	15.4%	1.2%	0.009 ^{x2}	0.749 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	32.7%	36.4%	25.2%	5.6%		
	Total	37.6%	41.5%	18.4%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	39.7%	46.2%	14.2%	-	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	32.7%	30.8%	36.4%	-		
	Total	37.6%	41.5%	20.9%	-		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.11. Asociación de la severidad y la extensión de arcobranquitis/branquiespinitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	65.6%	22.7%	10.9%	0.8%	0.094 ^{RV}	0.907 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	71.0%	12.1%	15.9%	0.9%		
	Total	67.2%	19.5%	12.4%	0.8%		
Extensión	Aleatorio	65.6%	20.2%	13.4%	0.8%	0.754 ^{RV}	
	Dirigido	71.0%	15.9%	12.1%	0.9%		
	Total	67.2%	18.9%	13.0%	0.8%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.12. Asociación de la severidad y la extensión de materia orgánica en la luz branquial con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	46.2%	48.2%	5.3%	0.4%	0.059 ^{RV}	0.920 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	58.9%	33.6%	7.5%	-		
	Total	50.0%	43.8%	5.9%	0.3%		
Extensión	Aleatorio	46.2%	41.7%	11.7%	0.4%	0.048 ^{RV}	
	Dirigido	58.9%	27.1%	14.0%	-		
	Total	50.0%	37.3%	12.4%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.A.13. Asociación del grado de infección por cocos en branquias con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p
Grado	Aleatorio	94.7%	3.6%	1.6%	-	0.909 ^{RV}
	Dirigido	95.3%	2.8%	1.9%	-	
	Total	94.9%	3.4%	1.7%	-	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 2.A.14. Asociación del grado de infección por *Epitheliocystis* en branquias con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p
Grado	Aleatorio	62.3%	33.6%	1.2%	2.8%	0.596 ^{RV}
	Dirigido	56.1%	40.2%	1.9%	1.9%	
	Total	60.5%	35.6%	1.4%	2.5%	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 2.A.15. Asociación del grado de infección por myxosporidios en branquias con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p
Grado	Aleatorio	89.1%	10.5%	0.4%	-	0.701 ^{RV}
	Dirigido	90.7%	8.4%	0.9%	-	
	Total	89.5%	9.9%	0.6%	-	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 2.A.16. Asociación del grado de infección por monogeneos en branquias con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	P
Grado	Aleatorio	52.2%	45.7%	1.2%	0.8%	0.100 ^{RV}
	Dirigido	40.2%	54.2%	3.7%	1.9%	
	Total	48.6%	48.3%	2.0%	1.1%	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Tabla 2.A.17. Asociación del grado de infección por *Trichodina-Chilodonella* en branquias con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	P
Grado	Aleatorio	58.7%	34.4%	3.2%	3.6%	<0.001 ^{x2}
	Dirigido	44.9%	19.6%	3.7%	31.8%	
	Total	54.5%	29.9%	3.4%	12.1%	

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson

Tabla 2.A.18. Asociación del grado de infección por trematodos digeneos en branquias con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	P
Grado	Aleatorio	95.1%	4.5%	0.4%	-	0.002 ^{RV}
	Dirigido	87.9%	5.6%	0.9%	5.6%	
	Total	92.9%	4.8%	0.6%	1.7%	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Anexo 2.B. Lesiones en ojo

Tabla 2.B.1. Asociación de la severidad y la extensión de coroiditis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	53.8%	27.1%	15.4%	3.6%	<0.001 ^{x2}	0.850 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	40.2%	19.6%	21.5%	18.7%		
	Total	49.7%	24.9%	17.2%	8.2%		
Extensión	Aleatorio	53.8%	32.4%	11.7%	2.0%	0.003 ^{x2}	
	Dirigido	40.2%	29.9%	27.1%	2.8%		
	Total	49.7%	31.6%	16.4%	2.3%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.B.2. Asociación de la severidad y la extensión de granulomas en ojo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	92.3%	2.8%	2.8%	2.0%	0.005 ^{RV}	0.985 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	79.4%	11.2%	6.5%	2.8%		
	Total	88.4%	5.4%	4.0%	2.3%		
Extensión	Aleatorio	92.3%	4.0%	2.8%	0.8%	0.005 ^{RV}	
	Dirigido	79.4%	15.0%	4.7%	0.9%		
	Total	88.4%	7.3%	3.4%	0.8%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.B.3. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis en ojo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	88.3%	9.7%	1.2%	0.8%	<0.001 ^{RV}	0.952 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	54.2%	17.8%	23.4%	4.7%		
	Total	78.0%	12.1%	7.9%	2.0%		
Extensión	Aleatorio	88.3%	9.7%	2.0%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	54.2%	28.0%	15.9%	1.9%		
	Total	78.0%	15.3%	6.2%	0.6%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.B.4. Asociación de la severidad y la extensión de exoftalmítis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	97.6%	1.2%	0.8%	0.4%	<0.001 ^{RV}	0.988 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	77.6%	4.7%	13.1%	4.7%		
	Total	91.5%	2.3%	4.5%	1.7%		
Extensión	Aleatorio	97.6%	1.6%	0.8%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	77.6%	11.2%	8.4%	2.8%		
	Total	91.5%	4.5%	3.1%	0.8%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Anexo 2.C. Lesiones en Sistema nervioso

Tabla 2.C.1. Asociación de la severidad y la extensión de granulomas en meninges con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	95.5%	1.2%	0.8%	2.4%	0.010 ^{RV}	0.990 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	87.9%	1.9%	7.5%	2.8%		
	Total	93.2%	1.4%	2.8%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	95.5%	2.0%	2.0%	0.4%	0.026 ^{RV}	
	Dirigido	87.9%	9.3%	1.9%	0.9%		
	Total	93.2%	4.2%	2.0%	0.6%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.C.2. Asociación de la severidad y la extensión de meningitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	76.9%	14.2%	4.5%	4.5%	<0.001 ^{x2}	0.946 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	36.4%	15.0%	12.1%	36.4%		
	Total	64.7%	14.4%	6.8%	14.1%		
Extensión	Aleatorio	76.9%	15.4%	5.7%	2.0%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	36.4%	18.7%	26.2%	18.7%		
	Total	64.7%	16.4%	11.9%	7.1%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.C.3. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis en meninges con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	88.3%	7.7%	2.8%	1.2%	<0.001 ^{RV}	0.969 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	48.6%	11.2%	36.4%	3.7%		
	Total	76.3%	8.8%	13.0%	2.0%		
Extensión	Aleatorio	88.3%	8.1%	2.8%	0.8%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	48.6%	14.0%	33.6%	3.7%		
	Total	76.3%	9.9%	12.1%	1.7%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.C.4. Asociación de la severidad y la extensión de encefalitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	96.8%	1.6%	0.8%	0.8%	<0.001 ^{RV}	0.971 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	72.9%	12.1%	11.2%	3.7%		
	Total	89.5%	4.8%	4.0%	1.7%		
Extensión	Aleatorio	96.8%	2.8%	0.4%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	72.9%	20.6%	5.6%	0.9%		
	Total	89.5%	8.2%	2.0%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.C.5. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis en encéfalo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	94.7%	3.2%	0.8%	1.2%	<0.001 ^{RV}	0.974 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	69.2%	15.9%	13.1%	1.9%		
	Total	87.0%	7.1%	4.5%	1.4%		
Extensión	Aleatorio	94.7%	4.9%	0.4%	0.0%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	69.2%	24.3%	6.5%	0.0%		
	Total	87.0%	10.7%	2.3%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.C.6. Asociación de la severidad y la extensión de ventriculitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	91.1%	3.6%	4.0%	1.2%	<0.001 ^{x2}	0.966 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	68.2%	8.4%	15.9%	7.5%		
	Total	84.2%	5.1%	7.6%	3.1%		
Extensión	Aleatorio	91.1%	7.3%	1.6%	0.0%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	68.2%	20.6%	11.2%	0.0%		
	Total	84.2%	11.3%	4.5%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.C.7. Asociación del grado de infección por bacterias cocoides en meninges con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p
Grado	Aleatorio	98.0%	0.4%	1.2%	0.4%	0.001 ^{RV}
	Dirigido	87.9%	2.8%	3.7%	5.6%	
	Total	94.9%	1.1%	2.0%	2.0%	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Anexo 2.D. Lesiones en riñón

Tabla 2.D.1. Asociación de la severidad y la extensión de nefritis intersticial perivascular con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	18.6%	52.2%	23.5%	5.7%	<0.001 ^{x2}	0.621 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	8.4%	29.0%	36.4%	26.2%		
	Total	15.5%	45.2%	27.4%	11.9%		
Extensión	Aleatorio	18.6%	40.5%	32.4%	8.5%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	8.4%	20.6%	50.5%	20.6%		
	Total	15.5%	34.5%	37.9%	12.1%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.D.2. Asociación de la severidad y la extensión de granulomas en intersticio renal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	82.6%	11.7%	4.9%	0.8%	0.065 ^{RV}	0.968 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	73.8%	12.1%	10.3%	3.7%		
	Total	79.9%	11.9%	6.5%	1.7%		
Extensión	Aleatorio	82.6%	11.3%	5.7%	0.4%	0.164 ^{RV}	
	Dirigido	73.8%	15.0%	11.2%	0.0%		
	Total	79.9%	12.4%	7.3%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.D.3. Asociación de la severidad y la extensión de activación de CMM en intersticio renal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	45.3%	48.6%	6.1%	0.0%	0.064 ^{RV}	0.880 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	43.9%	42.1%	13.1%	0.9%		
	Total	44.9%	46.6%	8.2%	0.3%		
Extensión	Aleatorio	45.3%	42.9%	11.3%	0.4%	0.248 ^{RV}	
	Dirigido	43.9%	37.4%	18.7%	0.0%		
	Total	44.9%	41.2%	13.6%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.D.4. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis en intersticio renal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	72.9%	23.9%	3.2%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.939 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	37.4%	29.9%	30.8%	1.9%		
	Total	62.1%	25.7%	11.6%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	72.9%	20.2%	6.5%	0.4%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	37.4%	24.3%	35.5%	2.8%		
	Total	62.1%	21.5%	15.3%	1.1%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.D.5. Asociación de la severidad y la extensión de gotas hialinas en túbulos renales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	85.4%	10.5%	2.8%	1.2%	<0.001 ^{x2}	0.956 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	57.0%	19.6%	13.1%	10.3%		
	Total	76.8%	13.3%	5.9%	4.0%		
Extensión	Aleatorio	85.4%	10.1%	4.5%	0.0%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	57.0%	14.0%	29.0%	0.0%		
	Total	76.8%	11.3%	11.9%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.D.6. Asociación de la severidad y la extensión de degeneración vacuolar en túbulos renales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	60.3%	24.3%	14.2%	1.2%	<0.001 ^{x2}	0.871 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	43.9%	15.9%	34.6%	5.6%		
	Total	55.4%	21.8%	20.3%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	60.3%	22.3%	17.4%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	43.9%	16.8%	38.3%	0.9%		
	Total	55.4%	20.6%	23.7%	0.3%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.D.7. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis/muerte de túbulos renales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	63.2%	19.4%	17.0%	0.4%	0.001 ^{RV}	0.880 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	54.2%	11.2%	30.8%	3.7%		
	Total	60.5%	16.9%	21.2%	1.4%		
Extensión	Aleatorio	63.2%	21.9%	15.0%	0.0%	0.016 ^{x2}	
	Dirigido	54.2%	17.8%	28.0%	0.0%		
	Total	60.5%	20.6%	18.9%	0.0%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.D.8. Asociación de la severidad y la extensión del paso de leucocitos en túbulos renales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	61.9%	33.6%	4.5%	0.0%	0.089 ^{x2}	0.904 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	65.4%	25.2%	9.3%	0.0%		
	Total	63.0%	31.1%	5.9%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	61.9%	13.4%	20.6%	4.0%	0.006 ^{x2}	
	Dirigido	65.4%	4.7%	29.9%	0.0%		
	Total	63.0%	10.7%	23.4%	2.8%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Anexo 2.E. Lesiones en corazón

Tabla 2.E.1. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis en corazón con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	88.7%	8.5%	1.2%	1.6%	<0.001 ^{x2}	0.949 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	44.9%	15.9%	29.0%	10.3%		
	Total	75.4%	10.7%	9.6%	4.2%		
Extensión	Aleatorio	88.7%	7.3%	3.2%	0.8%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	44.9%	24.3%	22.4%	8.4%		
	Total	75.4%	12.4%	9.0%	3.1%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.E.2. Asociación de la severidad y la extensión de endocarditis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	71.7%	21.5%	6.5%	0.4%	0.002 ^{RV}	0.931 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	72.0%	11.2%	12.1%	4.7%		
	Total	71.8%	18.4%	8.2%	1.7%		
Extensión	Aleatorio	71.7%	25.5%	2.8%	0.0%	0.073 ^{RV}	
	Dirigido	72.0%	19.6%	7.5%	0.9%		
	Total	71.8%	23.7%	4.2%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.E.3. Asociación de la severidad y la extensión de epicarditis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	72.5%	16.6%	6.1%	4.9%	<0.001 ^{x2}	0.924 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	35.5%	18.7%	15.0%	30.8%		
	Total	61.3%	17.2%	8.8%	12.7%		
Extensión	Aleatorio	72.5%	17.4%	5.3%	4.9%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	35.5%	27.1%	8.4%	29.0%		
	Total	61.3%	20.3%	6.2%	12.1%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.E.4. Asociación de la severidad y la extensión de granulomas en el corazón con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	89.9%	6.1%	2.0%	2.0%	0.150 ^{RV}	0.985 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	81.3%	9.3%	3.7%	5.6%		
	Total	87.3%	7.1%	2.5%	3.1%		
Extensión	Aleatorio	89.9%	6.5%	3.2%	0.4%	0.191 ^{RV}	
	Dirigido	81.3%	11.2%	6.5%	0.9%		
	Total	87.3%	7.9%	4.2%	0.6%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.E.5. Asociación de la severidad y la extensión de hipertrofia del endocardio con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	89.9%	6.9%	2.8%	0.4%	0.292 ^{RV}	0.975 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	88.8%	4.7%	6.5%	0.0%		
	Total	89.5%	6.2%	4.0%	0.3%		
Extensión	Aleatorio	89.9%	8.5%	1.6%	0.0%	0.776 ^{RV}	
	Dirigido	88.8%	8.4%	2.8%	0.0%		
	Total	89.5%	8.5%	2.0%	0.0%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.E.6. Asociación de la severidad y la extensión de miocarditis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	97.2%	1.2%	1.2%	0.4%	<0.001 ^{RV}	0.971 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	78.5%	6.5%	11.2%	3.7%		
	Total	91.5%	2.8%	4.2%	1.4%		
Extensión	Aleatorio	97.2%	2.4%	0.4%	-	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	78.5%	15.9%	5.6%	-		
	Total	91.5%	6.5%	2.0%	-		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.E.7. Asociación del grado de infección por cocos en el corazón con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	P
Grado	Aleatorio	98.8%	0.4%	0.4%	0.4%	<0.001 ^{RV}
	Dirigido	79.4%	5.6%	4.7%	10.3%	
	Total	92.9%	2.0%	1.7%	3.4%	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Anexo 2.F. Lesiones en estómago

Tabla 2.F.1. Asociación de la severidad y la extensión de alteraciones glandulares en la mucosa gástrica con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	92.7%	6.1%	1.2%	0.0%	0.050 ^{RV}	0.988 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	98.1%	0.9%	0.9%	0.0%		
	Total	94.4%	4.5%	1.1%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	92.7%	3.6%	2.8%	0.8%	0.038 ^{RV}	
	Dirigido	98.1%	0.0%	1.9%	0.0%		
	Total	94.4%	2.5%	2.5%	0.6%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.F.2. Asociación de la severidad y la extensión de detritus celulares en luz del estómago con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	74.1%	23.5%	2.4%	0.0%	0.083 ^{x2}	0.972 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	84.1%	13.1%	2.8%	0.0%		
	Total	77.1%	20.3%	2.5%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	74.1%	21.9%	4.0%	0.0%	0.118 ^{x2}	
	Dirigido	84.1%	13.1%	2.8%	0.0%		
	Total	77.1%	19.2%	3.7%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.F.3. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis/muerte del epitelio en la mucosa gástrica con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	35.6%	56.3%	8.1%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.762 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	21.5%	42.1%	33.6%	2.8%		
	Total	31.4%	52.0%	15.8%	0.8%		
Extensión	Aleatorio	35.6%	50.6%	13.4%	0.4%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	21.5%	32.7%	43.0%	2.8%		
	Total	31.4%	45.2%	22.3%	1.1%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.F.4. Asociación de la severidad y la extensión de inflamación de la mucosa gástrica con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	38.9%	46.6%	13.0%	1.6%	0.016 ^{RV}	0.706 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	27.1%	44.9%	26.2%	1.9%		
	Total	35.3%	46.0%	16.9%	1.7%		
Extensión	Aleatorio	38.9%	37.7%	21.1%	2.4%	0.103 ^{x2}	
	Dirigido	27.1%	44.9%	22.4%	5.6%		
	Total	35.3%	39.8%	21.5%	3.4%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.F.5. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis/muerte de la submucosa gástrica con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	91.1%	8.1%	0.8%	0.0%	0.000 ^{RV}	0.959 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	68.2%	21.5%	9.3%	0.9%		
	Total	84.2%	12.1%	3.4%	0.3%		
Extensión	Aleatorio	91.1%	8.5%	0.4%	0.0%	0.000 ^{RV}	
	Dirigido	68.2%	9.3%	20.6%	1.9%		
	Total	84.2%	8.8%	6.5%	0.6%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.F.6. Asociación de la severidad y la extensión de inflamación de la submucosa gástrica con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	32.4%	36.4%	26.3%	4.9%	<0.001 ^{x2}	0.714 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	20.6%	18.7%	47.7%	13.1%		
	Total	28.8%	31.1%	32.8%	7.3%		
Extensión	Aleatorio	32.4%	32.8%	31.2%	3.6%	0.023 ^{x2}	
	Dirigido	20.6%	28.0%	44.9%	6.5%		
	Total	28.8%	31.4%	35.3%	4.5%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Anexo 2.G. Lesiones en intestino

Tabla 2.G.1. Asociación de la severidad y la extensión de detritus celulares en la luz del intestino con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	54.7%	40.9%	4.0%	0.4%	0.065 ^{RV}	0.928 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	60.7%	29.0%	9.3%	0.9%		
	Total	56.5%	37.3%	5.6%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	54.7%	36.0%	9.3%	-	0.084 ^{RV}	
	Dirigido	60.7%	25.2%	13.1%	0.9%		
	Total	56.5%	32.8%	10.5%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.2. Asociación de la severidad y la extensión de liberación de moco en la luz intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	71.7%	23.5%	4.5%	0.4%	0.426 ^{RV}	0.935 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	71.0%	19.6%	8.4%	0.9%		
	Total	71.5%	22.3%	5.6%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	71.7%	19.8%	8.5%	0.0%	0.330 ^{x2}	
	Dirigido	71.0%	15.9%	13.1%	0.0%		
	Total	71.5%	18.6%	9.9%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.3. Asociación de la severidad y la extensión de material eosinófilico (proteína) en luz intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	92.3%	6.1%	1.6%	0.0%	0.040 ^{RV}	0.993 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	98.1%	1.9%	0.0%	0.0%		
	Total	94.1%	4.8%	1.1%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	92.3%	7.3%	0.4%	0.0%	0.057 ^{RV}	
	Dirigido	98.1%	1.9%	0.0%	0.0%		
	Total	94.1%	5.6%	0.3%	0.0%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.4. Asociación de la severidad y la extensión de migración de leucocitos en la mucosa intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	25.9%	64.0%	9.3%	0.8%	0.003 ^{RV}	0.688 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	27.1%	49.5%	23.4%	0.0%		
	Total	26.3%	59.6%	13.6%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	25.9%	13.8%	43.3%	17.0%	0.011 ^{x2}	
	Dirigido	27.1%	8.4%	57.9%	6.5%		
	Total	26.3%	12.1%	47.7%	13.8%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.5. Asociación de la severidad y la extensión de alteración de la arquitectura de los pliegues intestinales con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	85.0%	12.6%	2.4%	0.0%	0.313 ^{x2}	0.970 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	88.8%	7.5%	3.7%	0.0%		
	Total	86.2%	11.0%	2.8%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	85.0%	7.7%	5.7%	1.6%	0.146 ^{RV}	
	Dirigido	88.8%	3.7%	7.5%	0.0%		
	Total	86.2%	6.5%	6.2%	1.1%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.6. Asociación de la severidad y la extensión de activación de células caliciformes en la mucosa intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	30.8%	57.9%	9.7%	1.6%	<0.001 ^{x2}	0.729 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	17.8%	49.5%	28.0%	4.7%		
	Total	26.8%	55.4%	15.3%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	30.8%	25.9%	25.5%	17.8%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	17.8%	12.1%	47.7%	22.4%		
	Total	26.8%	21.8%	32.2%	19.2%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.7. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis/muerte en la mucosa intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	68.8%	26.7%	4.5%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.922 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	37.4%	39.3%	18.7%	4.7%		
	Total	59.3%	30.5%	8.8%	1.4%		
Extensión	Aleatorio	68.8%	21.5%	8.9%	0.8%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	37.4%	29.0%	32.7%	0.9%		
	Total	59.3%	23.7%	16.1%	0.8%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.8. Asociación de la severidad y la extensión de inflamación de la mucosa intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	83.8%	10.5%	4.0%	1.6%	0.009 ^{x2}	0.951 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	69.2%	15.9%	9.3%	5.6%		
	Total	79.4%	12.1%	5.6%	2.8%		
Extensión	Aleatorio	83.8%	5.3%	9.3%	1.6%	0.002 ^{x2}	
	Dirigido	69.2%	3.7%	21.5%	5.6%		
	Total	79.4%	4.8%	13.0%	2.8%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.9. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis/muerte de la submucosa intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	96.0%	2.8%	0.8%	0.4%	<0.001 ^{RV}	0.977 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	74.8%	15.9%	8.4%	0.9%		
	Total	89.5%	6.8%	3.1%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	96.0%	2.0%	2.0%	0.0%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	74.8%	10.3%	15.0%	0.0%		
	Total	89.5%	4.5%	5.9%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin

Tabla 2.G.10. Asociación de la severidad y la extensión de inflamación en la submucosa intestinal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	43.7%	34.8%	20.2%	1.2%	<0.001 ^{x2}	0.763 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	24.3%	25.2%	41.1%	9.3%		
	Total	37.9%	31.9%	26.6%	3.7%		
Extensión	Aleatorio	43.7%	24.7%	28.3%	3.2%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	24.3%	10.3%	58.9%	6.5%		
	Total	37.9%	20.3%	37.6%	4.2%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.G.11. Asociación de la severidad y la extensión de degeneración hialina en la muscular del intestino con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	99.6%	0.0%	0.4%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.989 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	79.4%	5.6%	13.1%	1.9%		
	Total	93.5%	1.7%	4.2%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	99.6%	0.0%	0.4%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	79.4%	7.5%	11.2%	1.9%		
	Total	93.5%	2.3%	3.7%	0.6%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Anexo 2.H. Lesiones en hígado

Tabla 2.H.1. Asociación de la severidad y la extensión de gotas hialinas en hepatocitos con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	96.8%	3.2%	0.0%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.983 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	86.0%	9.3%	4.7%	0.0%		
	Total	93.5%	5.1%	1.4%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	96.8%	1.2%	1.2%	0.8%	0.003 ^{RV}	
	Dirigido	86.0%	5.6%	2.8%	5.6%		
	Total	93.5%	2.5%	1.7%	2.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.H.2. Asociación de la severidad y la extensión de degeneración vacuolar en hepatocitos con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	76.1%	17.4%	6.5%	0.0%	<0.001 ^{x2}	0.896 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	39.3%	29.9%	20.6%	10.3%		
	Total	65.0%	21.2%	10.7%	3.1%		
Extensión	Aleatorio	76.1%	7.3%	6.9%	9.7%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	39.3%	12.1%	27.1%	21.5%		
	Total	65.0%	8.8%	13.0%	13.3%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.H.3. Asociación de la severidad y la extensión de hepatitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	55.1%	38.5%	5.3%	1.2%	<0.001 ^{RV}	0.885 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	32.7%	43.0%	20.6%	3.7%		
	Total	48.3%	39.8%	9.9%	2.0%		
Extensión	Aleatorio	55.1%	38.9%	5.7%	0.4%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	32.7%	39.3%	26.2%	1.9%		
	Total	48.3%	39.0%	11.9%	0.8%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.H.4. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis/muerte en hígado con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	87.9%	8.1%	4.0%	0.0%	0.000 ^{RV}	0.971 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	72.9%	11.2%	12.1%	3.7%		
	Total	83.3%	9.0%	6.5%	1.1%		
Extensión	Aleatorio	87.9%	10.1%	2.0%	0.0%	0.000 ^{x2}	
	Dirigido	72.9%	15.9%	11.2%	0.0%		
	Total	83.3%	11.9%	4.8%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: significancia según la prueba de razón de verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.H.5. Asociación de la severidad y la extensión de activación de CMM en hígado con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	89.1%	10.5%	0.4%	0.0%	0.134 ^{RV}	0.991 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	82.2%	17.8%	0.0%	0.0%		
	Total	87.0%	12.7%	0.3%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	89.1%	10.5%	0.4%	0.0%	0.040 ^{RV}	
	Dirigido	82.2%	14.0%	3.7%	0.0%		
	Total	87.0%	11.6%	1.4%	0.0%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Anexo 2.I. Lesiones en hepatopáncreas y peritoneo/páncreas

Tabla 2.I.1. Asociación de la severidad y la extensión de hepatopancreatitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	71.7%	25.1%	3.2%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.938 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	35.5%	40.2%	21.5%	2.8%		
	Total	60.7%	29.7%	8.8%	0.8%		
Extensión	Aleatorio	71.7%	22.3%	6.1%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	35.5%	30.8%	30.8%	2.8%		
	Total	60.7%	24.9%	13.6%	0.8%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.I.2. Asociación de la severidad y la extensión de activación de CMM en hepatopáncreas con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	84.2%	14.2%	1.6%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.978 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	61.7%	38.3%	0.0%	0.0%		
	Total	77.4%	21.5%	1.1%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	84.2%	14.6%	1.2%	0.0%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	61.7%	30.8%	7.5%	0.0%		
	Total	77.4%	19.5%	3.1%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.I.3. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis del hepatopáncreas con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	93.5%	6.1%	0.4%	0.0%	<0.001 ^{RV}	0.975 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	64.5%	30.8%	4.7%	0.0%		
	Total	84.7%	13.6%	1.7%	0.0%		
Extensión	Aleatorio	93.5%	6.1%	0.4%	0.0%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	64.5%	22.4%	13.1%	0.0%		
	Total	84.7%	11.0%	4.2%	0.0%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.I.4. Asociación de la severidad y la extensión de peritonitis/pancreatitis peritoneal con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	91.5%	4.0%	4.0%	0.4%	<0.001 ^{x2}	0.976 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	76.6%	9.3%	6.5%	7.5%		
	Total	87.0%	5.6%	4.8%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	91.5%	6.1%	2.4%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	76.6%	10.3%	11.2%	1.9%		
	Total	87.0%	7.3%	5.1%	0.6%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.I.5. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis del páncreas/peritoneo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	98.4%	0.8%	0.4%	0.4%	<0.001 ^{RV}	0.995 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	85.0%	5.6%	8.4%	0.9%		
	Total	94.4%	2.3%	2.8%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	98.4%	0.8%	0.8%	0.0%	<0.001 ^{RV}	
	Dirigido	85.0%	6.5%	8.4%	0.0%		
	Total	94.4%	2.5%	3.1%	0.0%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Anexo 2.J. Lesiones en bazo

Tabla 2.J.1. Asociación de la severidad y la extensión de activación de CMM en bazo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	20.2%	60.7%	18.2%	0.8%	0.004 ^{x2}	0.570 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	12.1%	58.9%	22.4%	6.5%		
	Total	17.8%	60.2%	19.5%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	20.2%	29.1%	32.8%	17.8%	0.221 ^{x2}	
	Dirigido	12.1%	29.0%	34.6%	24.3%		
	Total	17.8%	29.1%	33.3%	19.8%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.J.2. Asociación de la severidad y la extensión de degeneración de eritrocitos en bazo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	85.4%	10.5%	3.6%	0.4%	0.630 ^{RV}	0.972 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	82.2%	10.3%	6.5%	0.9%		
	Total	84.5%	10.5%	4.5%	0.6%		
Extensión	Aleatorio	85.4%	8.1%	6.1%	0.4%	0.195 ^{RV}	
	Dirigido	82.2%	5.6%	12.1%	-		
	Total	84.5%	7.3%	7.9%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.J.3. Asociación de la severidad y la extensión de depleción de linfocitos en bazo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	49.4%	27.9%	16.2%	6.5%	<0.001 ^{x2}	0.879 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	32.7%	11.2%	27.1%	29.0%		
	Total	44.4%	22.9%	19.5%	13.3%		
Extensión	Aleatorio	49.4%	11.7%	27.9%	10.9%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	32.7%	0.9%	31.8%	34.6%		
	Total	44.4%	8.5%	29.1%	18.1%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.J.4. Asociación de la severidad y la extensión de granulomas en bazo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	89.1%	4.0%	4.5%	2.4%	0.364 ^{RV}	0.991 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	83.2%	8.4%	4.7%	3.7%		
	Total	87.3%	5.4%	4.5%	2.8%		
Extensión	Aleatorio	89.1%	4.0%	4.5%	2.4%	0.311 ^{RV}	
	Dirigido	83.2%	5.6%	9.3%	1.9%		
	Total	87.3%	4.5%	5.9%	2.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.J.5. Asociación de la severidad y la extensión de muerte de leucocitos en bazo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	93.5%	5.7%	0.8%	-	0.072 ^{RV}	0.990 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	86.0%	11.2%	2.8%	-		
	Total	91.2%	7.3%	1.4%	-		
Extensión	Aleatorio	93.5%	4.5%	2.0%	-	0.092 ^{RV}	
	Dirigido	86.0%	9.3%	3.7%	0.9%		
	Total	91.2%	5.9%	2.5%	0.3%		

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.J.6. Asociación de la severidad y la extensión de necrosis en bazo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	90.3%	6.1%	3.2%	0.4%	<0.001 ^{x2}	0.964 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	47.7%	17.8%	27.1%	7.5%		
	Total	77.4%	9.6%	10.5%	2.5%		
Extensión	Aleatorio	90.3%	4.5%	5.3%	-	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	47.7%	13.1%	31.8%	7.5%		
	Total	77.4%	7.1%	13.3%	2.3%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.J.7. Asociación de la severidad y la extensión de esplenitis con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	p	Sev. / Ext.
Severidad	Aleatorio	67.2%	19.8%	11.7%	1.2%	<0.001 ^{x2}	0.884 ^{dS} (p<0.001)
	Dirigido	41.1%	21.5%	30.8%	6.5%		
	Total	59.3%	20.3%	17.5%	2.8%		
Extensión	Aleatorio	67.2%	10.1%	19.8%	2.8%	<0.001 ^{x2}	
	Dirigido	41.1%	15.9%	35.5%	7.5%		
	Total	59.3%	11.9%	24.6%	4.2%		

x2: Significación según la prueba Chi-cuadrado de Pearson; dS: Coeficiente simétrico d de Somers entre severidad y extensión sin estratificar

Tabla 2.J.8. Asociación del grado de infección por cocos en bazo con el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	P
Grado	Aleatorio	98.4%	1.2%	-	0.4%	<0.001 ^{RV}
	Dirigido	86.0%	1.9%	3.7%	8.4%	
	Total	94.6%	1.4%	1.1%	2.8%	

RV: Significación según la prueba de Razón de Verosimilitudes

Anexo 3. Correlaciones entre diagnóstico de estreptococosis y la calificación de la severidad y la extensión de cada una de las lesiones en cada tipo de muestreo

Las lesiones sometidas a la prueba d de Somers fueron aquellas con una frecuencia de presentación por encima del 5% (n=69) al igual que los agentes patógenos (n=10).

Anexo 3.A. Lesiones branquiales

Tabla 3.A.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de la activación de células calciformes en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	18.6%	35.0%	54.7%	71.4%	0.229	<0.001
	Dirigido	66.7%	69.4%	69.0%	100.0%	0.030	0.679
	Total	32.0%	43.1%	61.1%	77.8%	0.191	<0.001
Extensión	Aleatorio	18.6%	37.3%	45.3%	45.7%	0.159	<0.001
	Dirigido	66.7%	72.0%	67.4%	77.8%	0.019	0.787
	Total	32.0%	46.7%	53.7%	52.3%	0.125	0.002

Tabla 3.A.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de la atrofia y/o pérdida de lamelas branquiales según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	47.7%	28.6%	32.9%	22.7%	-0.132	0.004
	Dirigido	83.3%	66.7%	44.8%	55.6%	-0.277	<0.001
	Total	62.3%	36.4%	36.0%	28.3%	-0.212	<0.001
Extensión	Aleatorio	47.7%	29.0%	29.6%	-	-0.128	0.012
	Dirigido	83.3%	52.9%	46.2%	-	-0.288	<0.001
	Total	62.3%	34.8%	32.8%	-	-0.220	<0.001

Tabla 3.A.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de la degeneración del cartílago branquial según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	37.2%	13.3%	-	-	-0.247	0.018
	Dirigido	69.9%	66.7%	-	-	-0.202	0.454
	Total	47.3%	22.2%	-	-	-0.273	0.012
Extensión	Aleatorio	37.2%	13.3%	-	-	-0.247	0.018
	Dirigido	69.9%	50.0%	-	-	-0.197	0.462
	Total	47.3%	17.6%	-	-	-0.270	0.013

Tabla 3.A.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de desprendimiento de filamentos branquiales según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	37.2%	18.2%	23.1%	-	-0.158	0.083
	Dirigido	68.9%	100.0%	-	-	0.311	0.316
	Total	47.4%	25.0%	23.1%	-	-0.230	0.018
Extensión	Aleatorio	37.2%	21.4%	20.0%	-	-0.160	0.079
	Dirigido	68.9%	100.0%	-	-	0.311	0.316
	Total	47.4%	26.7%	20.0%	-	-0.231	0.017

Tabla 3.A.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de detritus celulares en la luz branquial según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.3%	29.2%	55.6%	100.0%	0.148	0.012
	Dirigido	59.4%	72.5%	73.3%	80.0%	0.094	0.188
	Total	44.2%	38.1%	62.7%	87.5%	0.129	0.005
Extensión	Aleatorio	33.3%	36.8%	35.1%	33.3%	0.004	0.931
	Dirigido	59.4%	71.4%	74.4%	100.0%	0.103	0.156
	Total	44.2%	44.4%	48.7%	50.0%	0.031	0.481

Tabla 3.A.6. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de hemorragias en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.9%	47.1%	100.0%	-	0.214	0.079
	Dirigido	68.0%	75.0%	100.0%	-	0.122	0.369
	Total	44.1%	56.0%	100.0%	-	0.195	0.042
Extensión	Aleatorio	33.9%	57.9%	-	-	0.208	0.089
	Dirigido	68.0%	77.8%	100.0%	-	0.121	0.379
	Total	44.1%	64.3%	50.0%	-	0.190	0.049

Tabla 3.A.7. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de hiperplasia de células calciformes en branquiespinas según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	36.8%	44.9%	16.7%	36.4%	-0.054	0.259
	Dirigido	71.4%	75.9%	70.0%	33.3%	-0.085	0.258
	Total	47.2%	54.1%	33.9%	35.5%	-0.062	0.141
Extensión	Aleatorio	36.8%	31.1%	35.3%	40.0%	-0.003	0.945
	Dirigido	71.4%	71.4%	64.3%	66.7%	-0.042	0.556
	Total	47.2%	43.9%	43.8%	48.3%	-0.016	0.715

Tabla 3.A.8. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de la hiperplasia interlamelar branquial según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	26.7%	26.4%	34.3%	58.3%	0.153	0.004
	Dirigido	78.6%	44.4%	70.7%	82.4%	0.100	0.158
	Total	51.7%	31.0%	44.8%	66.0%	0.130	0.004
Extensión	Aleatorio	26.7%	34.3%	31.7%	51.1%	0.099	0.099
	Dirigido	78.6%	67.9%	65.3%	75.0%	-0.017	0.798
	Total	51.7%	44.2%	41.4%	57.4%	0.032	0.455

Tabla 3.A.9. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de la branquitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	17.2%	29.8%	43.8%	66.7%	0.188	<0.001
	Dirigido	75.0%	53.3%	75.5%	75.0%	0.081	0.259
	Total	37.8%	34.7%	55.6%	69.6%	0.175	<0.001
Extensión	Aleatorio	17.2%	33.3%	37.6%	59.1%	0.136	0.005
	Dirigido	70.6%	66.7%	69.4%	72.7%	0.013	0.849
	Total	37.0%	41.9%	47.5%	63.6%	0.099	0.019

Tabla 3.A.10. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	21.4%	37.0%	63.2%	100.0%	0.248	<0.001
	Dirigido	62.9%	71.8%	70.4%	83.3%	0.068	0.335
	Total	32.3%	46.3%	66.2%	88.9%	0.218	<0.001
Extensión	Aleatorio	21.4%	39.5%	62.9%	-	0.235	<0.001
	Dirigido	62.9%	63.6%	79.5%	-	0.116	0.102
	Total	32.3%	44.9%	71.6%	-	0.229	<0.001

Tabla 3.A.11. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de arco-branquitis/branquiespinitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	35.2%	32.1%	40.7%	100.0%	0.027	0.651
	Dirigido	63.2%	92.3%	76.5%	100.0%	0.176	0.033
	Total	44.1%	43.5%	54.5%	100.0%	0.061	0.234
Extensión	Aleatorio	35.2%	30.0%	42.4%	100.0%	0.031	0.595
	Dirigido	63.2%	76.5%	92.3%	100.0%	0.203	0.009
	Total	44.1%	41.8%	56.5%	100.0%	0.065	0.207

Tabla 3.A.12. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de materia orgánica en la luz branquial según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	35.1%	36.1%	30.8%	100.0%	0.009	0.872
	Dirigido	66.7%	75.0%	62.5%	-	0.043	0.609
	Total	46.3%	45.2%	42.9%	100.0%	-0.010	0.846
Extensión	Aleatorio	35.1%	37.9%	31.0%	-	-0.005	0.917
	Dirigido	66.7%	69.0%	80.0%	-	0.067	0.388
	Total	46.3%	44.7%	47.7%	-	-0.007	0.882

Tabla 3.A.13. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por bacterias cocos en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	33.8%	66.7%	75.0%	-	0.352	0.026
	Dirigido	68.6%	66.7%	100.0%	-	0.116	0.534
	Total	44.3%	66.7%	83.3%	-	0.277	0.024

Tabla 3.A.14. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por *Epitheliocystis* en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	33.8%	41.0%	-	28.6%	0.036	0.552
	Dirigido	61.7%	76.7%	100.0%	100.0%	0.174	0.030
	Total	41.6%	53.2%	40.0%	44.4%	0.094	0.069

Tabla 3.A.15. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por myxosporidios en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	37.7%	15.4%	100.0%	-	-0.188	0.032
	Dirigido	70.1%	55.6%	100.0%	-	-0.096	0.553
	Total	47.6%	25.7%	100.0%	-	-0.174	0.038

Tabla 3.A.16. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por monogéneos en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	31.8%	38.9%	66.7%	50.0%	0.085	0.153
	Dirigido	51.2%	79.3%	100.0%	100.0%	0.290	<0.001
	Total	36.6%	52.6%	85.7%	75.0%	0.184	<0.001

Tabla 3.A.17. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por *Trichodinas-Chilodonellas* en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	37.9%	32.9%	12.5%	44.4%	-0.052	0.356
	Dirigido	56.3%	66.7%	75.0%	88.2%	0.224	0.001
	Total	42.5%	39.6%	33.3%	79.1%	0.112	0.016

Tabla 3.A.18. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por trematodos digéneos en branquias según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	36.6%	18.2%	-	-	-0.199	0.107
	Dirigido	69.1%	33.3%	100.0%	100.0%	0.023	0.858
	Total	45.9%	23.5%	50.0%	100.0%	-0.008	0.941

Anexo 3.B. Lesiones en ojo

Tabla 3.B.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de coroiditis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	P
Severidad	Aleatorio	18.8%	41.8%	68.4%	100.0%	0.357	<0.001
	Dirigido	32.6%	81.0%	100.0%	100.0%	0.451	<0.001
	Total	22.2%	51.1%	80.3%	100.0%	0.436	<0.001
Extensión	Aleatorio	18.8%	52.5%	58.6%	80.0%	0.322	<0.001
	Dirigido	32.6%	90.6%	96.6%	100.0%	0.453	<0.001
	Total	22.2%	63.4%	77.6%	87.5%	0.406	<0.001

Tabla 3.B.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de granulomas en el ojo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	P
Severidad	Aleatorio	31.1%	85.7%	85.7%	100.0%	0.570	<0.001
	Dirigido	61.2%	100.0%	100.0%	100.0%	0.361	<0.001
	Total	39.3%	94.7%	92.9%	100.0%	0.537	<0.001
Extensión	Aleatorio	31.1%	80.0%	100.0%	100.0%	0.574	<0.001
	Dirigido	61.2%	100.0%	100.0%	100.0%	0.368	<0.001
	Total	39.3%	92.3%	100.0%	100.0%	0.543	<0.001

Tabla 3.B.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis en ojo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	29.8%	79.2%	66.7%	100.0%	0.486	<0.001
	Dirigido	44.8%	94.7%	100.0%	100.0%	0.435	<0.001
	Total	33.0%	86.0%	96.4%	100.0%	0.546	<0.001
Extensión	Aleatorio	29.8%	75.0%	100.0%	-	0.490	<0.001
	Dirigido	44.8%	96.7%	100.0%	100.0%	0.444	<0.001
	Total	33.0%	87.0%	100.0%	100.0%	0.554	<0.001

Tabla 3.B.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de exoftalmítis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	34.9%	66.7%	100.0%	-	0.314	0.171
	Dirigido	61.4%	80.0%	100.0%	100.0%	0.326	<0.001
	Total	41.7%	75.0%	100.0%	83.3%	0.472	<0.001
Extensión	Aleatorio	34.9%	50.0%	100.0%	-	0.319	0.167
	Dirigido	61.4%	91.7%	100.0%	100.0%	0.322	<0.001
	Total	41.7%	81.3%	100.0%	100.0%	0.475	<0.001

Anexo 3.C. Lesiones en sistema nervioso

Tabla 3.C.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de granulomas en meninges según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	32.6%	100.0%	100.0%	100.0%	0.665	<0.001
	Dirigido	64.9%	100.0%	100.0%	100.0%	0.338	<0.001
	Total	41.8%	100.0%	100.0%	100.0%	0.569	<0.001
Extensión	Aleatorio	32.6%	100.0%	100.0%	100.0%	0.665	<0.001
	Dirigido	64.9%	100.0%	100.0%	100.0%	0.342	<0.001
	Total	41.8%	100.0%	100.0%	100.0%	0.571	<0.001

Tabla 3.C.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de meningitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	18.4%	88.6%	100.0%	100.0%	0.696	<0.001
	Dirigido	15.4%	100.0%	100.0%	100.0%	0.562	<0.001
	Total	17.9%	92.2%	100.0%	100.0%	0.681	<0.001
Extensión	Aleatorio	18.4%	89.5%	100.0%	100.0%	0.701	<0.001
	Dirigido	15.4%	100.0%	100.0%	100.0%	0.538	<0.001
	Total	17.9%	93.1%	100.0%	100.0%	0.681	<0.001

Tabla 3.C.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis en meninges según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	27.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.706	<0.001
	Dirigido	36.5%	100.0%	100.0%	100.0%	0.514	<0.001
	Total	28.9%	100.0%	100.0%	100.0%	0.654	<0.001
Extensión	Aleatorio	27.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.708	<0.001
	Dirigido	36.5%	100.0%	100.0%	100.0%	0.504	<0.001
	Total	28.9%	100.0%	100.0%	100.0%	0.654	<0.001

Tabla 3.C.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de encefalitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.5%	100.0%	100.0%	100.0%	0.658	0.003
	Dirigido	57.7%	100.0%	100.0%	100.0%	0.380	<0.001
	Total	39.4%	100.0%	100.0%	100.0%	0.585	<0.001
Extensión	Aleatorio	33.5%	100.0%	100.0%	-	0.663	0.003
	Dirigido	57.7%	100.0%	100.0%	100.0%	0.395	<0.001
	Total	39.4%	100.0%	100.0%	100.0%	0.594	<0.001

Tabla 3.C.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis en encéfalo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	32.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.669	<0.001
	Dirigido	55.4%	100.0%	100.0%	100.0%	0.397	<0.001
	Total	37.7%	100.0%	100.0%	100.0%	0.598	<0.001
Extensión	Aleatorio	32.1%	100.0%	100.0%	-	0.667	<0.001
	Dirigido	55.4%	100.0%	100.0%	-	0.415	<0.001
	Total	37.7%	100.0%	100.0%	-	0.610	<0.001

Tabla 3.C.6. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de ventriculitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	29.8%	88.9%	100.0%	100.0%	0.640	<0.001
	Dirigido	54.8%	100.0%	100.0%	100.0%	0.395	<0.001
	Total	35.9%	94.4%	100.0%	100.0%	0.591	<0.001
Extensión	Aleatorio	29.8%	94.4%	100.0%	-	0.648	<0.001
	Dirigido	54.8%	100.0%	100.0%	-	0.409	<0.001
	Total	35.9%	97.5%	100.0%	-	0.601	<0.001

Tabla 3.C.7. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por bacterias cocos en meninges según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	34.3%	100.0%	100.0%	100.0%	0.653	0.022
	Dirigido	64.9%	100.0%	100.0%	100.0%	0.336	<0.001
	Total	42.9%	100.0%	100.0%	100.0%	0.562	<0.001

Anexo 3.D. Lesiones en riñón

Tabla 3.D.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de nefritis intersticial perivascular según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	8.7%	33.3%	55.2%	64.3%	0.275	<0.001
	Dirigido	33.3%	45.2%	76.9%	96.4%	0.342	<0.001
	Total	12.7%	35.6%	63.9%	85.7%	0.353	<0.001
Extensión	Aleatorio	8.7%	30.0%	51.3%	61.9%	0.267	<0.001
	Dirigido	33.3%	50.0%	74.1%	90.9%	0.275	<0.001
	Total	12.7%	33.6%	60.4%	76.7%	0.320	<0.001

Tabla 3.D.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de granulomas en intersticio renal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	30.9%	44.8%	83.3%	100.0%	0.278	0.001
	Dirigido	65.8%	69.2%	90.9%	75.0%	0.126	0.139
	Total	40.6%	52.4%	87.0%	83.3%	0.258	<0.001
Extensión	Aleatorio	30.9%	46.4%	78.6%	100.0%	0.275	0.001
	Dirigido	65.8%	68.8%	91.7%	-	0.136	0.112
	Total	40.6%	54.5%	84.6%	100.0%	0.258	<0.001

Tabla 3.D.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de activación de CMM en intersticio renal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	18.8%	47.5%	66.7%	-	0.296	<0.001
	Dirigido	59.6%	75.6%	78.6%	100.0%	0.147	0.051
	Total	30.8%	55.2%	72.4%	100.0%	0.259	<0.001
Extensión	Aleatorio	18.8%	43.4%	71.4%	100.0%	0.306	<0.001
	Dirigido	59.6%	77.5%	75.0%	-	0.128	0.090
	Total	30.8%	52.7%	72.9%	100.0%	0.259	<0.001

Tabla 3.D.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis en intersticio renal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	25.6%	61.0%	75.0%	-	0.363	<0.001
	Dirigido	50.0%	65.6%	93.9%	100.0%	0.296	<0.001
	Total	30.0%	62.6%	90.2%	100.0%	0.400	<0.001
Extensión	Aleatorio	25.6%	56.0%	81.3%	100.0%	0.364	<0.001
	Dirigido	50.0%	73.1%	84.2%	100.0%	0.251	<0.001
	Total	30.0%	61.8%	83.3%	100.0%	0.390	<0.001

Tabla 3.D.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de gotas hialinas en túbulo renales según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	36.5%	30.8%	28.6%	33.3%	-0.057	0.480
	Dirigido	54.1%	81.0%	92.9%	100.0%	0.308	<0.001
	Total	40.4%	53.2%	71.4%	85.7%	0.229	<0.001
Extensión	Aleatorio	36.5%	20.0%	54.5%	-	-0.045	0.584
	Dirigido	54.1%	86.7%	90.3%	-	0.306	<0.001
	Total	40.4%	45.0%	81.0%	-	0.239	<0.001

Tabla 3.D.6. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de degeneración vacuolar en túbulo renales según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	28.9%	45.0%	51.4%	0.0%	0.147	0.008
	Dirigido	61.7%	41.2%	91.9%	66.7%	0.176	0.011
	Total	36.7%	44.2%	72.2%	44.4%	0.202	<0.001
Extensión	Aleatorio	28.9%	36.4%	58.1%	-	0.177	0.002
	Dirigido	61.7%	72.2%	75.6%	100.0%	0.115	0.121
	Total	36.7%	45.2%	66.7%	100.0%	0.205	<0.001

Tabla 3.D.7. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis/muerte de túbulo renales según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	25.6%	52.1%	54.8%	-	0.236	<0.001
	Dirigido	50.0%	91.7%	93.9%	75.0%	0.341	<0.001
	Total	32.2%	60.0%	72.0%	60.0%	0.306	<0.001
Extensión	Aleatorio	25.6%	42.6%	67.6%	-	0.268	<0.001
	Dirigido	50.0%	89.5%	93.3%	-	0.355	<0.001
	Total	32.2%	54.8%	79.1%	-	0.328	<0.001

Tabla 3.D.8. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión del paso de leucocitos en túbulo renales según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	P
Severidad	Aleatorio	31.4%	36.1%	90.9%	-	0.138	0.026
	Dirigido	67.1%	74.1%	70.0%	-	0.049	0.567
	Total	42.6%	45.5%	81.0%	-	0.105	0.042
Extensión	Aleatorio	31.4%	27.3%	51.0%	50.0%	0.123	0.030
	Dirigido	67.1%	60.0%	75.0%	-	0.064	0.464
	Total	42.6%	31.6%	60.2%	50.0%	0.101	0.040

Anexo 3.E. Lesiones en corazón

Tabla 3.E.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis en corazón según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	27.4%	100.0%	100.0%	100.0%	0.708	<0.001
	Dirigido	31.3%	100.0%	100.0%	100.0%	0.501	<0.001
	Total	28.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.652	<0.001
Extensión	Aleatorio	27.4%	100.0%	100.0%	100.0%	0.704	<0.001
	Dirigido	31.3%	100.0%	100.0%	100.0%	0.498	<0.001
	Total	28.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.656	<0.001

Tabla 3.E.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de endocarditis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	24.9%	56.6%	81.3%	100.0%	0.371	<0.001
	Dirigido	59.7%	83.3%	100.0%	100.0%	0.313	<0.001
	Total	35.4%	61.5%	89.7%	100.0%	0.359	<0.001
Extensión	Aleatorio	24.9%	60.3%	85.7%	-	0.376	<0.001
	Dirigido	59.7%	90.5%	100.0%	100.0%	0.317	<0.001
	Total	35.4%	67.9%	93.3%	100.0%	0.360	<0.001

Tabla 3.E.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de epicarditis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	14.0%	87.8%	100.0%	100.0%	0.722	<0.001
	Dirigido	21.1%	90.0%	93.8%	100.0%	0.500	<0.001
	Total	15.2%	88.5%	96.8%	100.0%	0.671	<0.001
Extensión	Aleatorio	14.0%	88.4%	100.0%	100.0%	0.724	<0.001
	Dirigido	21.1%	89.7%	100.0%	100.0%	0.511	<0.001
	Total	15.2%	88.9%	100.0%	100.0%	0.679	<0.001

Tabla 3.E.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de granulomas en el corazón según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	28.8%	93.3%	100.0%	100.0%	0.653	<0.001
	Dirigido	62.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.354	<0.001
	Total	38.2%	96.0%	100.0%	100.0%	0.573	<0.001
Extensión	Aleatorio	28.8%	93.8%	100.0%	100.0%	0.655	<0.001
	Dirigido	62.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.358	<0.001
	Total	38.2%	96.4%	100.0%	100.0%	0.576	<0.001

Tabla 3.E.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de hipertrofia del endocardio según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.8%	47.1%	57.1%	100.0%	0.182	0.089
	Dirigido	68.4%	60.0%	85.7%	-	0.071	0.580
	Total	44.2%	50.0%	71.4%	100.0%	0.155	0.070
Extensión	Aleatorio	33.8%	47.6%	75.0%	-	0.184	0.089
	Dirigido	68.4%	77.8%	66.7%	-	0.062	0.641
	Total	44.2%	56.7%	71.4%	-	0.153	0.077

Tabla 3.E.6. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de miocarditis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.8%	100.0%	100.0%	100.0%	0.657	0.006
	Dirigido	60.7%	100.0%	100.0%	100.0%	0.363	<0.001
	Total	40.7%	100.0%	100.0%	100.0%	0.576	<0.001
Extensión	Aleatorio	33.8%	100.0%	100.0%	-	0.660	0.006
	Dirigido	60.7%	100.0%	100.0%	-	0.373	<0.001
	Total	40.7%	100.0%	100.0%	-	0.583	<0.001

Tabla 3.E.7. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por bacterias cocos en el corazón según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	34.8%	100.0%	100.0%	100.0%	0.649	0.079
	Dirigido	61.2%	100.0%	100.0%	100.0%	0.359	<0.001
	Total	41.6%	100.0%	100.0%	100.0%	0.570	<0.001

Anexo 3.F. Lesiones en estómago

Tabla 3.F.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de alteraciones glandulares en mucosa gástrica según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	36.2%	33.3%	-	-	-0.087	0.427
	Dirigido	68.6%	100.0%	100.0%	-	0.313	0.154
	Total	46.4%	37.5%	25.0%	-	-0.114	0.306
Extensión	Aleatorio	36.2%	33.3%	-	100.0%	-0.082	0.456
	Dirigido	68.6%	-	100.0%	-	0.314	0.154
	Total	46.4%	33.3%	22.2%	100.0%	-0.110	0.322

Tabla 3.F.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de detritus celulares en luz gástrica según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	35.5%	36.2%	33.3%	-	0.003	0.962
	Dirigido	66.7%	85.7%	66.7%	-	0.148	0.169
	Total	45.8%	45.8%	44.4%	-	-0.001	0.981
Extensión	Aleatorio	35.5%	37.0%	30.0%	-	0.001	0.989
	Dirigido	66.7%	85.7%	66.7%	-	0.148	0.169
	Total	45.8%	47.1%	38.5%	-	-0.004	0.943

Tabla 3.F.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis/muerte en la mucosa gástrica según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	22.7%	41.7%	50.0%	-	0.181	0.001
	Dirigido	65.2%	64.4%	75.0%	100.0%	0.090	0.196
	Total	31.5%	47.3%	66.1%	100.0%	0.207	<0.000
Extensión	Aleatorio	22.7%	40.8%	48.5%	100.0%	0.176	0.001
	Dirigido	65.2%	62.9%	76.1%	66.7%	0.080	0.272
	Total	31.5%	45.6%	64.6%	75.0%	0.202	<0.000

Tabla 3.F.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de inflamación de la mucosa gástrica según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	27.1%	38.3%	46.9%	75.0%	0.136	0.009
	Dirigido	62.1%	62.5%	85.7%	100.0%	0.153	0.023
	Total	35.2%	45.4%	65.0%	83.3%	0.177	<0.001
Extensión	Aleatorio	27.1%	41.9%	38.5%	50.0%	0.096	0.049
	Dirigido	62.1%	68.8%	75.0%	83.3%	0.090	0.202
	Total	35.2%	51.1%	50.0%	66.7%	0.119	0.005

Tabla 3.F.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis/muerte de la submucosa gástrica según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.3%	60.0%	50.0%	-	0.255	0.031
	Dirigido	61.6%	82.6%	90.0%	100.0%	0.222	0.004
	Total	40.3%	72.1%	83.3%	100.0%	0.340	<0.001
Extensión	Aleatorio	33.6%	57.1%	100.0%	-	0.258	0.030
	Dirigido	61.6%	70.0%	90.9%	100.0%	0.232	0.002
	Total	40.3%	61.3%	91.3%	100.0%	0.345	<0.001

Tabla 3.F.6. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de inflamación de la submucosa gástrica según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	32.5%	28.9%	47.7%	41.7%	0.086	0.081
	Dirigido	59.1%	50.0%	74.5%	92.9%	0.190	0.004
	Total	38.2%	32.7%	59.5%	69.2%	0.168	<0.001
Extensión	Aleatorio	32.5%	32.1%	39.0%	66.7%	0.071	0.149
	Dirigido	59.1%	53.3%	81.3%	85.7%	0.187	0.006
	Total	38.2%	37.8%	55.2%	75.0%	0.143	0.001

Anexo 3.G. Lesiones en intestino

Tabla 3.G.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de detritus celulares en la luz intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	30.4%	41.6%	40.0%	100.0%	0.111	0.056
	Dirigido	63.1%	80.6%	70.0%	100.0%	0.130	0.107
	Total	41.0%	50.8%	55.0%	100.0%	0.108	0.030
Extensión	Aleatorio	30.4%	39.3%	52.2%	-	0.117	0.036
	Dirigido	63.1%	81.5%	71.4%	100.0%	0.125	0.113
	Total	41.0%	49.1%	59.5%	100.0%	0.110	0.021

Tabla 3.G.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de liberación de moco en la luz intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	34.5%	41.4%	27.3%	-	0.030	0.643
	Dirigido	71.1%	76.2%	33.3%	100.0%	-0.087	0.368
	Total	45.5%	50.6%	30.0%	50.0%	-0.002	0.977
Extensión	Aleatorio	34.5%	42.9%	28.6%	-	0.027	0.670
	Dirigido	71.1%	64.7%	64.3%	-	-0.060	0.520
	Total	45.5%	48.5%	42.9%	-	0.005	0.923

Tabla 3.G.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de material eosinofílico (proteína) en luz intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	36.0%	33.3%	25.0%	-	-0.044	0.686
	Dirigido	68.6%	100.0%	-	-	0.314	0.154
	Total	46.2%	41.2%	25.0%	-	-0.082	0.452
Extensión	Aleatorio	36.0%	33.3%	-	-	-0.045	0.685
	Dirigido	68.6%	100.0%	-	-	0.314	0.154
	Total	46.2%	40.0%	-	-	-0.082	0.455

Tabla 3.G.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión migración de leucocitos en la mucosa intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	23.4%	41.8%	26.1%	50.0%	0.089	0.105
	Dirigido	75.9%	73.6%	52.0%	-	-0.138	0.075
	Total	39.8%	49.8%	39.6%	50.0%	0.027	0.570
Extensión	Aleatorio	23.4%	29.4%	38.3%	52.4%	0.182	0.001
	Dirigido	75.9%	66.7%	69.4%	42.9%	-0.097	0.220
	Total	39.8%	37.2%	49.7%	51.0%	0.078	0.064

Tabla 3.G.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de alteración de la arquitectura de los pliegues intestinales según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	36.2%	32.3%	33.3%	-	-0.036	0.657
	Dirigido	66.3%	87.5%	100.0%	-	0.250	0.019
	Total	45.6%	43.6%	60.0%	-	0.017	0.816
Extensión	Aleatorio	36.2%	15.8%	50.0%	50.0%	-0.021	0.793
	Dirigido	66.3%	100.0%	87.5%	-	0.243	0.026
	Total	45.6%	30.4%	63.6%	50.0%	0.024	0.744

Tabla 3.G.6. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de activación de células caliciformes en la mucosa intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	30.3%	37.1%	37.5%	75.0%	0.075	0.175
	Dirigido	63.2%	64.2%	83.3%	60.0%	0.104	0.153
	Total	36.8%	44.4%	63.0%	66.7%	0.144	<0.001
Extensión	Aleatorio	30.3%	40.6%	36.5%	36.4%	0.032	0.483
	Dirigido	63.2%	61.5%	68.6%	79.2%	0.091	0.190
	Total	36.8%	44.2%	50.9%	51.5%	0.087	0.028

Tabla 3.G.7. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis/muerte en la mucosa intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	29.4%	43.9%	81.8%	-	0.209	0.001
	Dirigido	62.5%	71.4%	75.0%	80.0%	0.088	0.217
	Total	35.7%	54.6%	77.4%	80.0%	0.244	0.000
Extensión	Aleatorio	29.4%	41.5%	68.2%	50.0%	0.203	0.001
	Dirigido	62.5%	67.7%	77.1%	100.0%	0.106	0.135
	Total	35.7%	51.2%	73.7%	66.7%	0.242	0.000

Tabla 3.G.8. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de inflamación en la mucosa intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	34.3%	30.8%	60.0%	75.0%	0.093	0.262
	Dirigido	67.6%	76.5%	60.0%	83.3%	0.043	0.615
	Total	43.1%	48.8%	60.0%	80.0%	0.134	0.030
Extensión	Aleatorio	34.3%	30.8%	43.5%	75.0%	0.088	0.283
	Dirigido	67.6%	50.0%	73.9%	83.3%	0.063	0.462
	Total	43.1%	35.3%	58.7%	80.0%	0.139	0.026

Tabla 3.G.9. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis/muerte en la submucosa intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	34.2%	57.1%	100.0%	100.0%	0.359	0.048
	Dirigido	65.0%	70.6%	100.0%	100.0%	0.174	0.037
	Total	42.0%	66.7%	100.0%	100.0%	0.363	<0.001
Extensión	Aleatorio	34.2%	60.0%	80.0%	-	0.357	0.049
	Dirigido	65.0%	72.7%	87.5%	-	0.164	0.055
	Total	42.0%	68.8%	85.7%	-	0.359	<0.001

Tabla 3.G.10. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de inflamación en la submucosa intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	25.0%	36.0%	54.0%	100.0%	0.195	<0.001
	Dirigido	53.8%	70.4%	70.5%	100.0%	0.159	0.016
	Total	30.6%	44.2%	61.7%	100.0%	0.242	<0.001
Extensión	Aleatorio	25.0%	36.1%	50.0%	50.0%	0.172	<0.001
	Dirigido	53.8%	54.5%	76.2%	85.7%	0.194	0.014
	Total	30.6%	38.9%	62.4%	66.7%	0.233	<0.001

Tabla 3.G.11. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de Degeneración hialina en muscular intestinal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	35.4%	-	100.0%	-	0.646	0.315
	Dirigido	62.4%	100.0%	92.9%	100.0%	0.308	<0.001
	Total	42.3%	100.0%	93.3%	100.0%	0.524	<0.001
Extensión	Aleatorio	35.4%	-	100.0%	-	0.646	0.315
	Dirigido	62.4%	100.0%	91.7%	100.0%	0.306	<0.001
	Total	42.3%	100.0%	92.3%	100.0%	0.523	<0.001

Anexo 3.H. Lesiones en hígado

Tabla 3.H.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de gotas hialinas en hepatocitos según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	35.1%	50.0%	-	-	0.149	0.425
	Dirigido	68.5%	70.0%	80.0%	-	0.050	0.674
	Total	44.4%	61.1%	80.0%	-	0.208	0.056
Extensión	Aleatorio	35.1%	-	66.7%	100.0%	0.154	0.406
	Dirigido	68.5%	66.7%	66.7%	83.3%	0.052	0.655
	Total	44.4%	44.4%	66.7%	87.5%	0.210	0.051

Tabla 3.H.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de degeneración vacuolar en hepatocitos según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.5%	34.9%	62.5%	-	0.100	0.158
	Dirigido	50.0%	75.0%	81.8%	100.0%	0.258	<0.001
	Total	36.5%	52.0%	73.7%	100.0%	0.265	<0.001
Extensión	Aleatorio	33.5%	33.3%	41.2%	50.0%	0.091	0.179
	Dirigido	50.0%	53.8%	86.2%	91.3%	0.277	<0.001
	Total	36.5%	41.9%	69.6%	70.2%	0.249	<0.001

Tabla 3.H.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de hepatitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	P
Severidad	Aleatorio	20.6%	52.6%	61.5%	66.7%	0.312	<0.001
	Dirigido	40.0%	78.3%	90.9%	100.0%	0.333	<0.001
	Total	24.6%	61.0%	80.0%	85.7%	0.375	<0.001
Extensión	Aleatorio	20.6%	53.1%	64.3%	0.0%	0.311	<0.001
	Dirigido	40.0%	73.8%	100.0%	50.0%	0.352	<0.001
	Total	24.6%	59.4%	88.1%	33.3%	0.381	<0.001

Tabla 3.H.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis/muerte en hígado según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	30.0%	80.0%	70.0%	-	0.450	<0.001
	Dirigido	59.0%	91.7%	100.0%	100.0%	0.344	<0.001
	Total	37.6%	84.4%	87.0%	100.0%	0.465	<0.001
Extensión	Aleatorio	30.0%	76%	80.0%	-	0.459	<0.001
	Dirigido	59.0%	94.1%	100.0%	-	0.350	<0.001
	Total	37.6%	83.3%	94.1%	-	0.473	<0.001

Tabla 3.H.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de activación de CMM en hígado según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.2%	53.8%	100.0%	-	0.225	0.035
	Dirigido	68.2%	73.7%	-	-	0.055	0.626
	Total	43.2%	62.2%	100.0%	-	0.199	0.013
Extensión	Aleatorio	33.2%	53.8%	100.0%	-	0.225	0.035
	Dirigido	68.2%	66.7%	100.0%	-	0.065	0.546
	Total	43.2%	58.5%	100.0%	-	0.202	0.011

Anexo 3.I. Lesiones en hepatopáncreas y peritoneo/páncreas

Tabla 3.I.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de hepatopancreatitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	28.8%	50.0%	75.0%	-	0.241	<0.001
	Dirigido	52.6%	72.1%	87.0%	100.0%	0.227	0.001
	Total	33.0%	59.0%	83.9%	100.0%	0.317	<0.001
Extensión	Aleatorio	28.8%	50.9%	60.0%	-	0.231	0.001
	Dirigido	52.6%	63.6%	90.9%	100.0%	0.259	<0.001
	Total	33.0%	55.7%	81.3%	100.0%	0.316	<0.001

Tabla 3.I.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de activación de CMM en hepatopáncreas según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	29.8%	62.9%	100.0%	-	0.369	<0.001
	Dirigido	57.6%	87.8%	-	-	0.302	<0.001
	Total	36.5%	76.3%	100.0%	-	0.408	<0.001
Extensión	Aleatorio	29.8%	63.9%	100.0%	-	0.368	<0.001
	Dirigido	57.6%	84.8%	100.0%	-	0.289	<0.001
	Total	36.5%	73.9%	100.0%	-	0.405	<0.001

Tabla 3.I.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis del hepatopáncreas según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	31.6%	93.3%	100.0%	-	0.619	<0.001
	Dirigido	55.1%	93.9%	100.0%	-	0.377	<0.001
	Total	37.0%	93.8%	100.0%	-	0.566	<0.001
Extensión	Aleatorio	31.6%	93.3%	100.0%	-	0.619	<0.001
	Dirigido	55.1%	95.8%	92.9%	-	0.348	<0.001
	Total	37.0%	94.9%	93.3%	-	0.554	<0.001

Tabla 3.I.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de peritonitis/pancreatitis peritoneal según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	33.6%	30.0%	80.0%	100.0%	0.241	0.043
	Dirigido	64.6%	80.0%	71.4%	100.0%	0.188	0.024
	Total	41.9%	55.0%	76.5%	100.0%	0.298	<0.001
Extensión	Aleatorio	33.6%	46.7%	83.3%	-	0.238	0.047
	Dirigido	64.6%	72.7%	91.7%	100.0%	0.193	0.021
	Total	41.9%	57.7%	88.9%	100.0%	0.299	<0.001

Tabla 3.I.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis del peritoneo/páncreas según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	35.0%	50.0%	100.0%	100.0%	0.400	0.171
	Dirigido	65.9%	66.7%	100.0%	100.0%	0.219	0.024
	Total	43.4%	62.5%	100.0%	100.0%	0.414	<0.001
Extensión	Aleatorio	35.0%	50.0%	100.0%	-	0.401	0.171
	Dirigido	65.9%	71.4%	100.0%	-	0.219	0.025
	Total	43.4%	66.7%	100.0%	-	0.415	0.001

Anexo 3.J. Lesiones en bazo

Tabla 3.J.1. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de activación de CMM en bazo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	20.0%	32.0%	62.2%	100.0%	0.248	<0.001
	Dirigido	76.9%	61.9%	75.0%	100.0%	0.090	0.201
	Total	31.7%	40.8%	66.7%	100.0%	0.232	<0.001
Extensión	Aleatorio	20.0%	26.4%	43.2%	54.5%	0.188	<0.001
	Dirigido	76.9%	54.8%	75.7%	73.1%	0.061	0.366
	Total	31.7%	35.0%	53.4%	61.4%	0.173	<0.001

Tabla 3.J.2. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de degeneración de eritrocitos en bazo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	32.7%	42.3%	77.8%	100.0%	0.207	0.023
	Dirigido	64.8%	81.8%	100.0%	100.0%	0.243	0.006
	Total	42.1%	54.1%	87.5%	100.0%	0.237	<0.001
Extensión	Aleatorio	32.7%	45.0%	60.0%	100.0%	0.200	0.026
	Dirigido	64.8%	83.3%	92.3%	-	0.240	0.008
	Total	42.1%	53.8%	75.0%	100.0%	0.233	<0.001

Tabla 3.J.3. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de depleción de linfocitos en bazo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	24.6%	39.1%	52.5%	62.5%	0.203	<0.001
	Dirigido	37.1%	83.3%	72.4%	96.8%	0.345	<0.001
	Total	27.4%	45.7%	60.9%	85.1%	0.306	<0.001
Extensión	Aleatorio	24.6%	27.6%	47.8%	63.0%	0.216	<0.001
	Dirigido	37.1%	100.0%	70.6%	97.3%	0.396	<0.001
	Total	27.4%	30.0%	55.3%	82.8%	0.325	<0.001

Tabla 3.J.4. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de granulomas en bazo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	28.2%	90.0%	100.0%	100.0%	0.658	<0.001
	Dirigido	64.0%	88.9%	100.0%	100.0%	0.291	<0.001
	Total	38.5%	89.5%	100.0%	100.0%	0.548	<0.001
Extensión	Aleatorio	28.2%	90.0%	100.0%	100.0%	0.658	<0.001
	Dirigido	64.0%	83.3%	100.0%	100.0%	0.295	<0.001
	Total	38.5%	87.5%	100.0%	100.0%	0.550	<0.001

Tabla 3.J.5. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de muerte de leucocitos en bazo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	32.5%	78.6%	100.0%	-	0.486	<0.001
	Dirigido	65.2%	91.7%	100.0%	-	0.276	0.004
	Total	41.8%	84.6%	100.0%	-	0.449	<0.001
Extensión	Aleatorio	32.5%	72.7%	100.0%	-	0.485	<0.001
	Dirigido	65.2%	100.0%	75.0%	100.0%	0.264	0.007
	Total	41.8%	85.7%	88.9%	100.0%	0.444	<0.001

Tabla 3.J.6. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de necrosis en bazo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	30.0%	86.7%	87.5%	100.0%	0.560	<0.001
	Dirigido	43.1%	78.9%	100.0%	100.0%	0.414	<0.001
	Total	32.5%	82.4%	97.3%	100.0%	0.551	<0.001
Extensión	Aleatorio	30.0%	90.9%	84.6%	-	0.558	<0.001
	Dirigido	43.1%	85.7%	94.1%	100.0%	0.402	<0.001
	Total	32.5%	88.0%	91.5%	100.0%	0.548	<0.001

Tabla 3.J.7. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad y la extensión de esplenitis según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Severidad	Aleatorio	25.3%	55.1%	55.2%	100.0%	0.287	<0.001
	Dirigido	50.0%	60.9%	97.0%	85.7%	0.303	<0.001
	Total	30.5%	56.9%	77.4%	90.0%	0.349	<0.001
Extensión	Aleatorio	25.3%	44.0%	63.3%	57.1%	0.294	<0.001
	Dirigido	50.0%	76.5%	84.2%	87.5%	0.253	<0.001
	Total	30.5%	57.1%	72.4%	73.3%	0.336	<0.001

Tabla 3.J.8. Asociación de la prevalencia de estreptococosis con el grado de infección por bacterias cocos en bazo según el tipo de muestreo

	Muestreo	0	1	2	3	d de Somers	p
Grado	Aleatorio	34.6%	100.0%	-	100.0%	0.652	0.041
	Dirigido	64.1%	100.0%	100.0%	100.0%	0.343	<0.001
	Total	42.7%	100.0%	100.0%	100.0%	0.563	<0.001

Anexo 4. Lesiones con correlación baja o muy baja con diagnóstico de estreptococosis causada por *S. agalactiae* ST 260

Tabla 4.1. Lesiones con correlación baja o muy baja entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias del muestreo aleatorio

Lesión	Frec. (%) muestreo aleatorio	Correlación severidad-estreptoc.		Correlación extensión-estreptoc.	
		d Somers	p	d Somers	p
Endocarditis	28.3	0.371	<0.001	0.376	<0.001
Activación CMM en hepatopáncreas	15.8	0.369	<0.001	0.368	<0.001
Necrosis en intersticio renal	27.1	0.363	<0.001	0.364	<0.001
Necrosis/muerte en submucosa intestinal	4.0	0.359	0.048	0.357	0.049
Coroiditis	46.2	0.357	<0.001	0.322	<0.001
Hepatitis	44.9	0.312	<0.001	0.311	<0.001
Esplenitis	32.8	0.287	<0.001	0.294	<0.001
Nefritis intersticial perivascular	81.4	0.275	<0.001	0.267	<0.001
Necrosis/muerte en submucosa gástrica	8.9	0.255	0.031	0.258	0.030
Necrosis en branquias	60.3	0.248	<0.001	0.235	<0.001
Activación de CMM en bazo	79.8	0.248	<0.001	0.188	<0.001
Peritonitis/pancreatitis peritoneal	8.5	0.241	0.043	0.238	0.047
Hepatopancreatitis	28.3	0.241	<0.001	0.231	<0.001
Necrosis/muerte en túbulos renales	36.8	0.236	<0.001	0.268	<0.001
Activación células caliciformes en branquias	71.7	0.229	<0.001	0.159	<0.001
Activación de CMM en hígado	10.9	0.225	0.035	0.225	0.035
Necrosis/muerte en mucosa intestinal	31.2	0.209	<0.001	0.203	<0.001
Depleción de linfocitos en bazo	50.6	0.203	<0.001	0.216	<0.001
Inflamación en submucosa intestinal	56.3	0.195	<0.001	0.172	<0.001
Branquitis	88.3	0.188	<0.001	0.136	0.005
Migración leucocitos en mucosa intestinal	74.1	0.089	0.105	0.182	<0.001
Necrosis/muerte en epitelio de mucosa gástrica	64.4	0.181	<0.001	0.176	<0.001
Detritus celulares en la luz branquial	81.8	0.148	0.012	0.004	0.931
Degeneración vacuolar en túbulos renales	39.7	0.147	0.008	0.177	0.002
Paso de leucocitos en túbulos renales	38.1	0.138	0.026	0.123	0.030
Inflamación en mucosa gástrica	61.1	0.136	0.009	0.096	0.049
Atrofia/ pérdida de lamelas branquiales	65.2	-0.132	0.004	-0.128	0.012

Tabla 4.2. Lesiones con correlación baja o muy baja entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias del muestreo dirigido

Lesión	Frec. (%) muestreo aleatorio	Correlación severidad-estreptoc.		Correlación extensión-estreptoc.	
		d Somers	p	d Somers	p
Depleción de linfocitos en bazo	67.3	0.345	<0.001	0.396	<0.001
Encefalitis	27.1	0.380	<0.001	0.395	<0.001
Necrosis en hepatopáncreas	35.5	0.377	<0.001	0.348	<0.001
Miocarditis	21.5	0.363	<0.001	0.373	<0.001
Granulomas en ojo	20.6	0.361	<0.001	0.368	<0.001
Necrosis/muerte de túbulos renales	45.8	0.341	<0.001	0.355	<0.001
Hepatitis	67.3	0.333	<0.001	0.352	<0.001
Necrosis/muerte en hígado	27.1	0.344	<0.001	0.350	<0.001
Nefritis intersticial perivascular	91.6	0.342	<0.001	0.275	<0.001
Granulomas en meninges	12.1	0.338	<0.001	0.342	<0.001
Exoftalmítis	22.4	0.326	<0.001	0.322	<0.001
Endocarditis	28.0	0.313	<0.001	0.317	<0.001
Degeneración hialina en muscular intestinal	20.6	0.308	<0.001	0.306	<0.001
Gotas hialinas en túbulos renales	43.0	0.308	0.035	0.306	0.035
Esplenitis	58.9	0.303	<0.001	0.253	<0.001
Activación de CMM en hepatopáncreas	38.3	0.302	<0.001	0.289	<0.001
Necrosis en intersticio renal	62.6	0.296	<0.001	0.251	<0.001
Degeneración vacuolar en hepatocitos	60.7	0.258	<0.001	0.277	<0.001
Hepatopancreatitis	64.5	0.227	<0.001	0.259	<0.001
Necrosis/muerte en submucosa gástrica	31.8	0.222	0.004	0.232	0.002
Necrosis en peritoneo/páncreas	15.0	0.219	0.024	0.219	0.025
Inflamación en submucosa intestinal	75.7	0.159	0.016	0.194	0.014
Peritonitis/pancreatitis peritoneal	23.4	0.188	0.024	0.193	0.021
Inflamación en submucosa gástrica	79.4	0.190	0.004	0.187	0.006
Degeneración vacuolar en túbulos renales	56.1	0.176	0.011	0.115	0.121
Necrosis/muerte de la submucosa intestinal	25.2	0.174	0.037	0.164	0.055
Inflamación en la mucosa gástrica	72.9	0.153	0.023	0.090	0.202
Atrofia/ pérdida de lamelas branquiales	43.9	-0.277	<0.001	-0.288	<0.001

Tabla 4.3. Lesiones con correlación baja o muy baja entre el diagnóstico compatible con estreptococosis y el grado de severidad y/o extensión en tilapias sin considerar tipo de muestreo

Lesión	Frec. (%) muestreo aleatorio	Correlación severidad-estreptoc.		Correlación extensión-estreptoc.	
		d Somers	p	d Somers	p
Activación de CMM en intersticio renal	55.1	0.259	<0.001	0.259	<0.001
Granulomas en intersticio renal	20.1	0.258	<0.002	0.258	<0.001
Degeneración eritrocitos en bazo	15.5	0.237	<0.003	0.233	<0.001
Hemorragias en branquias	8.5	0.195	0.042	0.190	0.049
Hiperplasia interlamelar branquial	91.8	0.130	0.004	0.032	0.455
Detritus celulares en la luz intestinal	43.5	0.108	0.030	0.110	0.021
Degeneración del cartílago branquial	5.6	-0.273	0.012	-0.270	0.013

Anexo 5. Lesiones incluidas en los modelos de regresión logística según la correlación de la prevalencia de estreptococosis con la severidad o la extensión de las lesiones

Las lesiones seleccionadas fueron aquellas que mostraron una correlación significativa de la severidad y/o la extensión con la prevalencia de estreptococosis según la prueba d de Somers.

Tabla 5.1. Lesiones incluidas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general o inespecífico

Lesión	Frecuencia en muestreo general (%)	Correlación estreptococosis vs ...		Criterio para evaluar
		Severidad	Extensión	
Granulomas en corazón	12.7	0.573	0.576	Extensión
Granulomas en bazo	12.7	0.548	0.550	Extensión
Muerte de leucocitos en bazo	8.8	0.449	0.444	Severidad
Bacterias cocos en branquias	5.1	0.277		
Activación de CMM en intersticio renal	55.1	0.259	0.259	Severidad
Granulomas en intersticio renal	20.1	0.258	0.258	Severidad
Degeneración de eritrocitos en bazo	15.5	0.237	0.233	Severidad
Hemorragias branquiales	8.5	0.195	0.190	Severidad
Monogeneos en branquias	51.4	0.184		
Hiperplasia interlamelar branquial	91.8	0.130	*	Severidad
Detritus celulares en la luz intestinal	43.5	0.108	0.110	Extensión
Myxosporidiosis en branquias	10.5	-0.174		
Degeneración del cartilago branquial	5.6	-0.273	-0.270	Severidad

* Valor de d de Somers no significativo ($p < 0.050$)

Tabla 5.2.1. Lesiones incluidas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado procedentes del muestro aleatorio

Lesión	Frecuencia en muestreo aleatorio (%)	Correlación estreptococosis vs ...		Criterio para evaluar
		Severidad	Extensión	
Epicarditis	27.5	0.722	0.724	Extensión
Necrosis en corazón	11.3	0.708	0.704	Severidad
Necrosis en meninges	11.7	0.706	0.708	Extensión
Meningitis	23.1	0.696	0.701	Extensión
Necrosis en encéfalo	5.3	0.669	0.667	Severidad
Granulomas en meninges	4.5	0.665	0.665	Severidad
Encefalitis	3.2	0.658	0.663	Extensión
Miocarditis	2.8	0.657	0.660	Extensión
Bacterias cocos en meninges	2.0	0.653		
Bacterias cocos en bazo	1.6	0.652		
Ventriculitis	8.9	0.640	0.648	Extensión

Tabla 5.2.1 (cont.). Lesiones incluidas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado procedentes del muestro aleatorio

Lesión	Frecuencia en muestro aleatorio (%)	Correlación estreptococosis vs ...		Criterio para evaluar
		Severidad	Extensión	
Necrosis en hepatopáncreas	6.5	0.619	0.619	Severidad
Granulomas en ojo	7.7	0.570	0.574	Extensión
Necrosis en bazo	9.7	0.560	0.558	Severidad
Necrosis en ojo	11.7	0.486	0.490	Extensión
Necrosis/muerte en hígado	12.1	0.450	0.459	Extensión
Endocarditis	28.3	0.371	0.376	Extensión
Activación de CMM en hepatopáncreas	15.8	0.369	0.368	Severidad
Necrosis del intersticio renal	27.1	0.363	0.364	Extensión
Necrosis/muerte en submucosa intestinal	4.0	0.359	0.357	Severidad
Coroiditis	46.2	0.357	0.322	Severidad
Hepatitis	44.9	0.312	0.311	Severidad
Esplenitis	32.8	0.287	0.294	Extensión
Nefritis intersticial perivascular	81.4	0.275	0.267	Severidad
Necrosis/muerte en submucosa gástrica	8.9	0.255	0.258	Extensión
Hepatopancreatitis	28.3	0.241	0.231	Severidad
Peritonitis/pancreatitis peritoneal	8.5	0.241	0.238	Severidad
Necrosis/muerte de túbulos renales	36.8	0.236	0.268	Extensión
Depleción de leucocitos en bazo	50.6	0.203	0.216	Extensión
Inflamación en la submucosa intestinal	56.3	0.195	0.172	Severidad
Degeneración vacuolar de túbulos renales	39.7	0.147	0.177	Extensión
Inflamación en la submucosa gástrica	61.1	0.136	0.096	Severidad
Atrofia/pérdida de lamelas branquiales	65.2	-0.132	-0.128	Severidad

* Valor de d de Somers no significativo ($p < 0.050$)

Tabla 5.2.2. Lesiones incluidas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado procedentes del muestro dirigido

Lesión	Frecuencia en muestro dirigido (%)	Correlación estreptococosis vs ...		Criterio para evaluar
		Severidad	Extensión	
Meningitis	63.6	0.562	0.538	Severidad
Necrosis en meninges	51.4	0.514	0.504	Severidad
Epicarditis	64.5	0.500	0.511	Extensión
Necrosis en corazón	55.1	0.501	0.498	Severidad
Coroiditis	59.8	0.451	0.453	Extensión
Necrosis en ojo	45.8	0.435	0.444	Extensión
Necrosis en bazo	52.3	0.414	0.402	Severidad
Necrosis en encéfalo	30.8	0.397	0.415	Extensión
Ventriculitis	31.8	0.395	0.409	Extensión
Encefalitis	27.1	0.380	0.395	Extensión
Necrosis de hepatopáncreas	35.5	0.377	0.348	Severidad
Miocarditis	21.5	0.363	0.373	Extensión

Tabla 5.2.2 (cont.). Lesiones incluidas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo general avanzado procedentes del muestro dirigido

Lesión	Frecuencia en muestro dirigido (%)	Correlación estreptococosis vs ...		Criterio para evaluar
		Severidad	Extensión	
Granulomas en ojo	20.6	0.361	0.368	Extensión
Depleción de linfocitos en bazo	67.3	0.345	0.396	Extensión
Necrosis/muerte en hígado	27.1	0.344	0.350	Extensión
Bacterias cocos en bazo	14	0.343		
Necrosis/muerte de túbulos renales	45.8	0.341	0.355	Extensión
Hepatitis	67.3	0.333	0.352	Extensión
Nefritis intersticial perivascular	91.6	0.342	0.275	Severidad
Granulomas en meninges	12.1	0.338	0.342	Extensión
Bacterias cocos en meninges	12.1	0.336		
Endocarditis	28.0	0.313	0.317	Extensión
Esplenitis	58.9	0.303	0.253	Severidad
Activación de CMM en hepatopáncreas	38.3	0.302	0.289	Severidad
Necrosis del intersticio renal	62.6	0.296	0.251	Severidad
Hepatopancreatitis	64.5	0.227	0.259	Extensión
Necrosis /muerte en la submucosa gástrica	31.8	0.222	0.232	Extensión
Inflamación en la submucosa intestinal	75.7	0.159	0.194	Extensión
Peritonitis/pancreatitis peritoneal	23.4	0.188	0.193	Extensión
Degeneración vacuolar en túbulos renales	56.1	0.176	*	Severidad
Necrosis/muerte en la submucosa intestinal	25.2	0.174	*	Severidad
Inflamación en la submucosa gástrica	72.9	0.153	*	Severidad
Atrofia/pérdida de lamelas branquiales	43.9	-0.277	-0.288	Extensión

* Valor de d de Somers no significativo ($p < 0.050$)

Tabla 5.3. Lesiones incluidas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo aleatorio adicionales a las incluidas en la Tabla 5.2.1

Lesión	Frecuencia en muestro aleatorio (%)	Correlación estreptococosis vs ...		Criterio para evaluar
		Severidad	Extensión	
Activación de CMM en bazo	79.8	0.248	0.188	Severidad
Necrosis branquial	60.3	0.248	0.235	Severidad
Activación de células caliciformes branquiales	71.7	0.229	0.159	Severidad
Activación de CMM en hígado	10.9	0.225	0.225	Severidad
Necrosis/muerte en la mucosa intestinal	31.2	0.209	0.203	Severidad
Branquitis	88.3	0.188	0.136	Severidad
Migración de leucocitos en mucosa intestinal	74.1	*	0.182	Extensión
Necrosis/muerte en la mucosa gástrica	64.4	0.181	0.176	Severidad
Detritus celulares en la luz branquial	81.8	0.148	*	Severidad
Paso de leucocitos en los túbulos renales	38.1	0.138	0.123	Severidad

* Valor de d de Somers no significativo ($p < 0.050$)

Tabla 5.4. Lesiones incluidas en la prueba de regresión logística para la creación de un modelo dirigido adicionales a las incluidas en la Tabla 5.2.2

Lesión	Frecuencia en muestreo dirigido (%)	Correlación estreptococosis vs ...		Criterio para evaluar
		Severidad	Extensión	
Bacterias cocos en corazón	5.1	0.359		
Exoftalmitis	2.4	0.326	0.322	Severidad
Degeneración en la muscular del intestino	0.4	0.308	0.306	Severidad
Gotas hialinas en túbulos renales	14.6	0.308	0.306	Severidad
Degeneración vacuolar de hepatocitos	23.9	0.258	0.277	Extensión
<i>Trichodina-Chilodonella</i> en branquias	51.4	0.224		
Necrosis del peritoneo/páncreas	1.6	0.219	0.219	Severidad
Inflamación en la submucosa gástrica	67.6	0.190	0.187	Severidad