



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

Efectividad de dos vacunas Nacionales para la
prevención de la Yersiniosis causada por la cepa
atípica de Yersinia Ruckeri en Salmo Salar

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

Francisco Javier Chia Ramos
Valdivia Chile 1997

PROFESOR PATROCINANTE : DR. RICARDO ENRIQUEZ S.

COLABORADORES : DR. HUGO FOLCH V.

: T.M. MONICA HONRAS S.

PROFESORES CALIFICADORES : DRA. XIMENA ROJAS S.

DR. RAFAEL BURGOS A.

FECHA DE APROBACION : 19 DE MARZO DE 1997

Al inspirador de esta gran verdad:
"Aun el tiempo indefinido ha puesto
en el corazón de ellos, para que la
humanidad nunca descubra la obra
que el Dios verdadero ha hecho
desde el comienzo hasta el fin"

y a mi amada Familia.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCION	3
4. MATERIAL Y METODO	8
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSION	19
8. ANEXO	28
9. AGRADECIMIENTOS	29

1. RESUMEN

En 1994 se aíslan de la salmonicultura nacional cepas atípicas de **Yersinia ruckeri** (inmóvil y resistente al ácido oxolínico). Ante esta nueva situación surge la necesidad de poder evaluar la efectividad de las vacunas comerciales actualmente en uso contra el patógeno.

Con este propósito se conformaron 3 grupos de salmones del atlántico (*Salmo salar*) vacunados contra la Enfermedad de la Boca Roja, (ERM: Enteric Redmouth Disease), con las denominaciones **A**: grupo de peces vacunados por la empresa Aquachile, **B**: grupo de peces vacunados con la vacuna desarrollada por Veterquímica y **C**: grupo control no vacunado. Ambos grupos vacunados contaban a la fecha del experimento con un mes de vacunados por el método de inmersión, con la siguiente distribución : **A**= 60 peces; **B**= 56 peces; **C**= 56 peces. Estos fueron desafiados con una solución de bacterias viables de $1,2 \times 10^7$ bacterias/ml por el método de inmersión, por un tiempo de 30 minutos en estanques con difusores de oxígeno. Se consideró como día 0 el día del desafío y se controlaron las mortalidades a partir del día 1 hasta el día 10 en que se dio por terminado el experimento. Se obtuvieron las siguientes mortalidades: grupo **A** 31,6%; grupo **B** 24%; grupo **C** 91%. A los peces muertos se les realizó un examen anatomopatológico completo, además se tomaron muestras de riñón, cerebro, hígado y bazo para tinción de Gram y para siembra en medio TSA (Trypticase Soy Agar), confirmando los aislamientos a través de las pruebas bioquímicas de oxidasa, motilidad y pruebas serológicas como aglutinación rápida en placa con antisuero de **Y. ruckeri** tipo I. Adicionalmente se obtuvo muestras de suero de los peces sobrevivientes a la fecha de término del experimento para cuantificar anticuerpos por el método de ELISA (Enzyme Linked Immune Assay).

Para calcular la efectividad de las vacunas se utilizó el porcentaje relativo de supervivencia (RPS) el que resultó ser de 65,27% para el grupo **A** y de 73,62% para el grupo **B**, no existiendo diferencias estadísticamente.

Al concluir este ensayo se pudo establecer que ambas vacunas protegen en un grado aceptable contra cepa atípica de **Y. ruckeri**.

Palabras claves: **Yersinia ruckeri**, cepa atípica, vacunas, S. salar.

2. SUMMARY

Atypical strains of *Yersinia ruckeri* (non motile and oxolinic acid resistant) were isolated from the Chilean salmon environment in 1994. Based on the presence of this new pathogenic strains, it was necessary to evaluate the effectiveness of the commercial vaccine currently used in Chile against Enteric Redmouth Disease (ERM).

Three groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*) previously vaccinated against the ERM were prepared. Group **A** contained fish vaccinated with the Aquachile vaccine. Group **B** contained fish vaccinated with the Veterquimica vaccine and Group **C** containing no vaccinated fish as control group. At the date of starting the experiment, groups **A** and **B** have been already vaccinated one month earlier by immersion procedure. Groups **A**, **B** and **C** had 60, 56, and 56 fish respectively. All the fish were challenged with a suspension of viable bacterial cells ($1,2 \times 10^7$ cells/ml) by a 30 minutes immersion procedure. The mortality and temperature were recorded daily. The experiment period was 10 days. the cumulative mortalities at the end of the experiment was 31,6%; 24%; and 91% for group A,B and C respectively. A complete post mortem examination was performed to all dead fish in order to confirm that the fish were killed by the challenge. Furthermore, samples of kidney, brain, liver and spleen were obtained and processed for Gram stain and cultured in TSA(Trypticase Soy Agar). All suspected colonies were submitted to biochemical and serological test such as oxidase, motility and agglutination using anti *Y. ruckeri* type I polyclonal antibody. At the end of experiment, all the survivor fish were killed and the serum collected to detect and quantify the specific antibody level by Enzyme Linked Immune Assay (ELISA).

The Relative Percentage Survival (RPS) was calculated to estimate the effectiveness each vaccines. The result showed 65,27% RPS for group **A** and 73,62% RPS for group **B**.

The conclusion of this research was that both vaccines gave a certain degree of protection in those fish challenged with atypical strain of *Y. Ruckeri*.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, atypical strains, vaccines, *S. salar*

3. INTRODUCCION

En estas dos últimas décadas la acuicultura a experimentado una importante expansión hasta convertirse en la industria que hoy conocemos en diversas partes del mundo (Ellis, 1988); Chile por su parte está dentro de los principales productores y exportadores de salmón y trucha (Alvarado y col., 1990). Actualmente es el segundo productor mundial después de Noruega con una cosecha para el año 1995 de aproximadamente 111.000 toneladas, de las cuales 42.000 correspondieron a salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Méndez, 1995).

Lo anteriormente expuesto se sustenta en las ventajas comparativas que muestra Chile con respecto a otras zonas geográficas del mundo, como son la baja contaminación de los recursos hídricos tanto dulces como salinos, abundancia de sitios de ambiente estuarino, temperatura y luminosidad en épocas invernales, lo que explica la mayor tasa de crecimiento de los peces comparado con el hemisferio norte, bajo costo del alimento, gran movimiento de mareas, cambio estacional con respecto al hemisferio norte, con lo cual se abastece ese mercado en épocas diferentes a las que lo hacen los otros países productores (Méndez y Munita, 1989; Macaya, 1994).

No se puede, sin embargo, dejar de mencionar que, aunado a tan alto aumento en la producción, los peces han debido ser criados en condiciones de alta densidad poblacional y manejo intensivo (Schäfer y col., 1990), debido a lo cual las enfermedades infectocontagiosas se han convertido en una amenaza constante para la piscicultura nacional. El abastecimiento continuo de ovas provenientes de Europa y Norteamérica, llevan a que exista permanentemente el riesgo de aparición y diseminación de nuevas enfermedades (Reyes, 1983 y 1985; Bustos, 1993).

Para nuestro medio, la mayoría de las enfermedades son de reciente aparición y por ello de gran impacto. Los peces se ven afectados por una multiplicidad de enfermedades infecciosas y parasitarias. Una enfermedad reciente es la enfermedad entérica de la boca roja (ERM: Enteric Redmouth Disease), considerada como una de las enfermedades infectocontagiosas de mayor trascendencia en salmonídeos, comparable a la furunculosis (Enríquez y Zamora, 1987).

El agente etiológico de esta enfermedad ***Yersinia ruckeri*** fue aislado por primera vez en Hagerman Valley, Idaho, EEUU en 1950 a partir de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Rucker, 1966; Ross y col., 1966). Se describió como una bacteria Gram-negativa, fermentativa y con flagelos peritricos, móvil, de 0,5 por 1,5-2.0 μm , perteneciente a la familia **Enterobacteriaceae** (Ross y col., 1966; Davies y Frerichs, 1989).

Existen 5 serotipos reconocidos de **Y. ruckeri** descritos por diferentes autores: Tipo I Hagerman; Tipo II O'leary; Tipo III Australiano; Tipo IV y Tipo V.

El tipo I es el más común y virulento, la virulencia va en descenso en los siguientes serotipos y actualmente no se considera al serotipo IV debido a la diferencia en el contenido G+C del DNA (Davies, 1990; Bullock y col., 1978; Stevenson y Daly, 1982; Daly y col., 1986) .

En nuestro país el primer aislamiento fue realizado en el río Valdivia desde carpas silvestres (*Cyprinus carpio*) asintomáticas (Enríquez y Zamora, 1987). Posteriormente se describe en salmón del atlántico (*Salmo salar*) juvenil desde el lago Llanquihue (Bravo, 1993). Se confirma su presencia en una unidad de smoltificación de alevines de salmón del atlántico en el estuario de Reloncavi (López, 1996).

La bacteria **Y. ruckeri** causa una enfermedad septicémica de curso agudo a crónico en los salmonídeos (Tebbit y col., 1981).

Los signos típicos de la infección son aletargamiento, oscurecimiento del dorso, marcada exoftalmia, hemorragias subcutáneas e inflamación en las mandíbulas, opérculos, paladar y base de las aletas (Tebbit y col., 1981). A la necropsia se puede observar hemorragias petequiales en músculo, grasa corporal y en la porción distal del intestino, el que además está lleno de un fluido amarillento, mucoso y sin contenido fecal (Austin y Austin, 1987; Rodgers, 1991).

La transmisión de **Y. ruckeri** es primariamente horizontal, es decir, de pez infectado a pez susceptible a través del agua (Rodgers, 1991), pero la enfermedad solo se presenta en peces que han sido expuestos a un gran número de bacterias (Ross y col., 1966). Un importante rol en la transmisión de la patología realizan los peces portadores clínicamente sanos, que son reservorios de la bacteria, los cuales como consecuencia de factores estresantes pueden gatillar la presentación de un brote (Bush y Lingg, 1975; Fuhrmann y col., 1983).

El diagnóstico está basado en el aislamiento de **Y. ruckeri** a partir de riñón, intestino posterior y fecas, sin embargo con facilidad es también posible aislarla de cerebro, hígado y bazo. El medio de cultivo de elección es el medio TSA (Trypticase Soy Agar) por un tiempo 48 horas a 20-24 °C (Busch y Lingg, 1975), e identificación a través de baterías bioquímicas como el API-20E (Barja y Toranzo, 1988; Dear, 1988). (Ewing y col., 1978), existen además pruebas serológicas como la aglutinación rápida en placa, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Olesen, 1991; Arkoosh y Kaatari, 1990), Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT) (Bush y Lingg, 1975).

El tratamiento habitual de la enfermedad y sus brotes ha consistido en el uso de antibióticos, como la sulfamerazina, oxitetraciclina y el ácido oxolínico, sin embargo se han aislado cepas resistentes a ácido oxolínico a partir de 1994 y ya para 1996 se a hecho presente una cepa multirresistente (Madrid, 1996. Comunicación personal)¹. Por ende allí radica la importancia del desarrollo de vacunas para el control de la ERM (Ellis, 1988).

La primera vacuna probada contra **Y. ruckeri** correspondió a un preparado de bacterias muertas por fenol e incorporadas en el alimento a la razón de 15 ml de concentrado de bacterias en 10 kg de alimento. Este alimento fue administrado a truchas arcoiris cinco veces por semana hasta el fin del ensayo. Después de 70 días los peces inmunizados demostraron un 90% de protección frente al desafío por inyección de bacterias que mató a un 90% del grupo control. La protección persistió por 408 días tiempo que duró la experiencia (Ross y Klontz, 1965).

El desarrollo comercial de productos biológicos para peces comenzó recién en 1974; ya para 1976 el Servicio Veterinario del Departamento de Agricultura de los EEUU concedió la primera licencia para un producto biológico para ser usado en peces (Tebbit y col., 1981). Este producto correspondió a una bacterina preparada a partir de un cultivo completo de **Y.ruckeri** tipo I.

Respecto a la vía de vacunación se compararon cuatro sistemas : inyección, ducha, inmersión y aerosol. Al realizar los desafíos a los 25, 76 y 125 días post vacunación se concluyó que la mayor efectividad se obtiene utilizando la vacunación por inyección (Johnson y Amend, 1983a). Esta última requiere que los peces estén anestesiados, tanto para facilitar el manejo como para disminuir el estrés. La vía de inyección es la intraperitoneal, y es el método más efectivo en términos de grado de protección, rapidez en la aparición de la protección y duración de esta, uso económico de la vacuna y certeza de que cada pez ha recibido la dosis adecuada (Ellis, 1988).

Las desventajas de la inyección se basan en la necesidad de usar anestésicos, el estrés de la manipulación de los peces que puede desencadenar brotes de la enfermedad, no puede ser usada en peces pequeños y requiere mucha mano de obra (Ellis, 1988).

La vía oral tiene la ventaja de evitar el estrés en los peces, puede ser usada con cualquier tamaño de pez y es realmente el único medio disponible en situaciones en donde el acceso a la piscicultura es limitado. La desventaja es que requiere de mayor cantidad de antígeno y por períodos de tiempo más prolongados.

¹ E. Madrid. Curso de Capacitación Inmunología y Vacunación de Salmones y Truchas. Puerto Montt, 24 y 25 de Septiembre de 1996.

Además nunca es posible estar seguro que los peces han recibido la cantidad adecuada de la vacuna. Debe señalarse que posiblemente el antígeno sufre una degradación por enzimas digestivas del estómago de tal manera que cuando alcanza el intestino la cantidad de antígeno sería insuficiente para desencadenar la respuesta inmune o se encontraría alterado (Ellis, 1988).

Con el desarrollo de la vacunación por inmersión contra *Vibrio anguillarum* en 1977, se hizo evidente que ésta técnica era también altamente efectiva para prevenir la ERM y mejor comparativamente que la vacunación oral (Ellis, 1988).

La vacunación por inmersión involucra poner a los peces en una solución diluida de la vacuna por un período de tiempo determinado. Las principales ventajas es ser capaz de inducir buenos niveles de protección y es adecuada para vacunar peces pequeños y en forma masiva (Ellis, 1988).

Si bien los resultados obtenidos con las vacunas importadas en una primera instancia fueron positivos, cabe destacar que las cepas presentes en el medio nacional, tienen características particulares de allí la importancia del desarrollo de vacunas a partir de aislados nacionales. Además son necesarios constantes monitoreos para que la actualización de las nuevas vacunas contengan las variantes serotípicas presentes en el medio acuático nacional (Briones, 1995).

Una manera de proteger a los peces contra las emergentes cepas y sus variantes es testear las vacunas en actual uso y medir la eficacia y la potencia de éstas. Los métodos tradicionales para esto son el cálculo del porcentaje relativo de supervivencia (RPS) y el aumento de la dosis letal 50 (LD50).

El RPS, es adecuado para ensayos experimentales y de campo. Consiste básicamente en desafiar a dos grupos de peces (vacunados y no vacunados) con un aislado virulento del patógeno en estudio. Las bases descritas por Ellis, (1988) para utilizar este método son las siguientes:

- Utilizar al menos 25 peces por cada grupo experimental
- El desafío debería causar al menos el 60% de morbilidad o mortalidad en el grupo de peces controles y en un período de tiempo similar al de una infección natural
- Las causas de las mortalidades deben ser determinadas
- Las infecciones no específicas no deberían exceder del 10% en cualquier grupo
- La mortalidad del grupo vacunado debería ser inferior al 24% para poder considerar el test como positivo.

El aumento de la dosis letal 50 (LD50) se basa en la determinación del número de organismos virulentos requeridos para matar el 50% de los peces. El test entrega una información más cuantitativa de la vacuna pero es más complicada de realizar (Farias, 1996. Comunicación personal)². Al menos 6 individuos de cada grupo experimental son desafiados con una dosis creciente del patógeno vivo. El número de organismos necesarios para matar el 50% de los peces vacunados y no vacunados se determina posteriormente usando la formula de Reed y Muench (Ellis, 1988).

Para monitorear la respuesta inmune inducida por una vacuna existe una variedad de métodos. Algunos de ellos son técnicas bastante simples y rápidas de realizar tales como la medición de anticuerpos humorales, lizosimas, fagocitosis y actividad NTB (Adams, 1996. Comunicación personal)³. La técnica de ELISA tiene aplicaciones universales ya que puede utilizarse para detectar haptenos, antígenos o anticuerpos implicados en enfermedades infecciosas como no infecciosas. Se basa en que el antígeno o anticuerpo se inmoviliza en una superficie sólida de soporte para permitir la fijación del reactivo marcado que reacciona y la elusión de aquel que no lo ha hecho. La degradación enzimática de un sustrato cromógeno produce un factor de amplificación que facilita la detección sensible y precisa la presencia de la enzima fijada a la fase sólida (Arkoosh y Kaattari, 1990).

El propósito del estudio es testear dos vacunas, una comercial de uso masivo en la salmonicultura y otra experimental desarrollada por un laboratorio privado para el control de la nueva cepa atípica de **Y. ruckeri** Tipo I inmóvil y resistente al ácido oxolínico, a través de la determinación del RPS. Se utilizará adicionalmente ELISA para medir la presencia de anticuerpos en los peces desafiados.

² C. Farias, Ictiopatología. Universidad Austral de Chile. Comunicación personal, 1996.

³ A. Adams. Curso de Capacitación Inmunología y Vacunación de Salmones y Truchas. Puerto Montt, 24 y 25 de Septiembre de 1996.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO :

Esta constituido por los siguientes grupos de peces:

-Salmo salar 60 peces con un peso que fluctuó entre los 10 y 12 gramos, vacunados contra la ERM por la empresa Aquachile por el método de inmersión rápida a la dilución 1:10 por un tiempo de exposición de 30 segundos y que a la fecha del experimento contaban con un mes de vacunados. Además recibieron un buster oral, con el mismo preparado vaccinal.

-Salmo salar 56 peces con un peso que fluctuó entre los 7 y 8,5 gramos, vacunados contra la ERM, con una vacuna desarrollada por la empresa Veterquímica⁴ por el método de inmersión rápida a la dilución 1:10 por un tiempo de exposición de 30 segundos y que a la fecha del experimento contaban con un mes de vacunados.

-Salmo salar 56 peces con un peso que fluctuó entre los 7 y 8,5 gramos, no vacunados contra la enfermedad y sin antecedentes de Yersiniosis.

Ambos grupos de peces vacunados corresponden a stocks nacionales provenientes de empresas salmoneras de la décima región.

Se utilizó la cepa nacional de **Yersinia ruckeri** 90/95 variedad inmóvil y resistente al ácido oxolínico, mantenida congelada a -25 °C (Protect. Technical Service Consultand Limited T.S.C. England) en el cepario de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UACH.

4.2 METODO

4.2.1 Recepción de los grupos experimentales.

A los peces, sin historial de Yersiniosis, se les tomó asépticamente muestras de cerebro, riñón, hígado e intestino para Gram y cultivo en medio TSA. Luego fueron distribuidos en sus respectivos estanques con las denominaciones **A**(grupo de peces Aquachile), **B**(grupo de peces Veterquímica), **C**(grupo de peces no vacunado). A continuación se procedió a controlar la temperatura y el oxígeno del agua de los estanques diariamente y equilibrar

⁴ YENI-VAC * : Bacterina comercial de **Yersinia ruckeri**, fabricada por el Laboratorio Veterquímica. Camino a Melipilla 5641 - casilla 81 Cerrillos. Teléfono : 5574004 Santiago.

la biomasa de cada uno de los mencionados para asemejar condiciones en cada estanque.

4.2.2 Preparación de la suspensión desafío.

A partir de la cepa se sembró una placa de medio TSA a 22 °C durante 24 horas. Se realizó confirmación mediante tinción de Gram y reacción de aglutinación rápida en placa con el antisuero de **Yersinia ruckeri** tipo I. Una vez realizada la confirmación se llevó a cabo el traspaso a caldo cerebro-corazón el que fue cultivado por 24 horas a temperatura ambiente. Con posterioridad el caldo se procedió a centrifugar a 3.500 rpm por 15 minutos obteniéndose un concentrado húmedo de bacterias, y a partir de este concentrado se determinó una suspensión bacteriana a una concentración de 1.2×10^7 bacterias por ml confirmada a través de densidad óptica medida en un fotocolorímetro (Vital Scientific Vitalab 10) a 610 nm (Kinzel, 1995).

4.2.3 Desafío

Se consideró como día 0 el día del desafío, este se llevó a cabo en tres estanques pequeños con sus respectivos difusores de oxígeno bajo el método de inmersión por un tiempo de 30 minutos (Bullock y col., 1981). La temperatura a la cual se realizó el desafío fue de 18 °C. Con posterioridad se controlaron las mortalidades a partir del día 1 hasta el día 10 en que se dio por terminado el experimento. A los peces muertos se le realizó un examen anatomopatológico completo, siguiendo un protocolo de necropsia en base a la técnica descrita por Post (1987).

4.2.4 Toma de muestras para exámenes bacteriológicos e identificación bacteriana.

Se tomaron asépticamente muestras de riñón, cerebro, hígado y bazo para exámenes bacteriológicos de cada pez muerto. Con asa micrón se sembró en placa con medio TSA por 24 horas a la temperatura de 20-22 °C. A su vez se hicieron frotis de riñón para realizar tinciones de Gram. En los casos en que hubo crecimiento de colonias, se observaron y registraron sus características tales como forma, tamaño, crecimiento, bordes, color, etc.

Las colonias que debido a sus características resultaron sospechosas de ser **Yersinia ruckeri** se les realizó tinción de Gram, prueba de oxidasa, de motilidad y de aglutinación rápida en placa con antisuero de **Yersinia ruckeri** tipo I.

4.2.5 Medición de la efectividad de las vacunas.

4.2.5.1. RPS

Se determinó la efectividad de las vacunas por el método de Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS: Relative Percent Survival) (Ellis, 1988) que se expresa en la fórmula siguiente:

$$\text{RPS} = \left[1 - \frac{\text{Porcentaje de mortalidad en vacunados}}{\text{Porcentaje de mortalidad en no vacunados}} \right] \times 100$$

Tanto para los grupos vacunados **A** Aquachile como para el **B** Veterquímica la ecuación correspondió a 1 menos el porcentaje de mortalidad de cada uno de los correspondientes dividido por el porcentaje de mortalidad del grupo control **C** multiplicado por 100.

Para el cálculo de RPS solo se consideraron las muertes específicas por **Yersinia ruckeri** a partir del día 0 del desafío hasta el día 10 de término del experimento.

4.2.5.2 Cuantificación de anticuerpos.

Se cuantificaron anticuerpos contra **Yersinia ruckeri** a través de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Engwall y Perlman, 1972; Arkoosh y Kaattari, 1990), montado por el Instituto de Inmunología de la UACH, obteniéndose para ello suero de los peces vacunados que sobrevivieron al día 10 de término de la experiencia.

El protocolo fue el siguiente:

1. Incubar la placa de ELISA con antígeno (proteína de **Y. ruckeri** 100 ul por pocilio) por 16 horas a 4° C.
2. Bloquear con tween PBS (TPBS) al 0,5% (100 ul por pocillo) por 60 minutos a 37° C. Lavar con TPBS al 0,05% (tres veces).
3. Se adiciona la muestra problema, a las diluciones 1:10; 1:100; etc. por un tiempo 180 minutos a 37° C. Lavar con TPBS al 0,05% (tres veces).
4. Agregar anti-IgM de Salmón hecho en cabra (1 ug / 100 ul) por un tiempo 90 minutos a 37° C. Lavar con TPBS al 0,05% (tres veces).

5. Agregar IgG de cabra hecho en conejo conjugado con peroxidasa por un tiempo de 30 minutos a 37° C. Lavar con TPBS al 0,05% (tres veces).
6. Revelado con OPD (ortofenildiamino) al 0,04% por un tiempo de 5 minutos.
7. Bloquear con 50 ul de ácido sulfúrico 2,5 M.
8. Lectura a 492 nm (Labsystems Uniskan I).

4.2.5.2 Análisis bioestadístico.

Para el análisis de los resultados del RPS se utilizó el método bioestadístico de Prueba de Independencia (Huntsberger, 1967) .

4.4 EQUIPOS :

- 3 estanques de 400 lt.
- 3 filtros y sus respectivos difusores.
- Medio de cultivo TSA (Tryptycase Soy Agar)
- Tubos Mac Farland
- Toda la infraestructura e instrumentos, batería bioquímica necesarios para el apoyo del paso experimental, del laboratorio de Ictiopatología de la facultad de Ciencias Veterinarias de la UACH.
- Montaje para ELISA del Instituto de Inmunología de la UACH.
- Formalina y cloro

5. RESULTADOS

A continuación serán expuestos los resultados del desafío, análisis bacteriológicos, cálculo de efectividad de las vacunas testeadas a través de RPS, como a su vez la determinación de la presencia de anticuerpos mediante ELISA.

5.1 Desafío

Tabla N°1: Tasas de mortalidad diaria atribuible a **Yersinia ruckeri** en cada uno de los grupos S. salar vacunados, Aquachile, Veterquímica y control no vacunado posterior al desafío.

tiempo post desafío (en días)	Aquachile		Veterquímica		control no vacunado	
	N°	%	N°	%	N°	%
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	1	2	0	0	3	5
4	2	3	3	5	42	75
5	8	13	2	4	3	5
6	6	10	3	5	1	2
7	1	2	3	5	1	2
8	1	2	0	0	1	2
9	0	0	3	5	0	0
10	0	0	0	0	0	0
Total	19	32	14	24	51	91

Se puede apreciar en la página siguiente, los gráficos con las mortalidades diarias (gráfico N°1) y mortalidades acumuladas (gráfico N°2) de S. salar desafiados con **Y. ruckeri** cepa atípica.

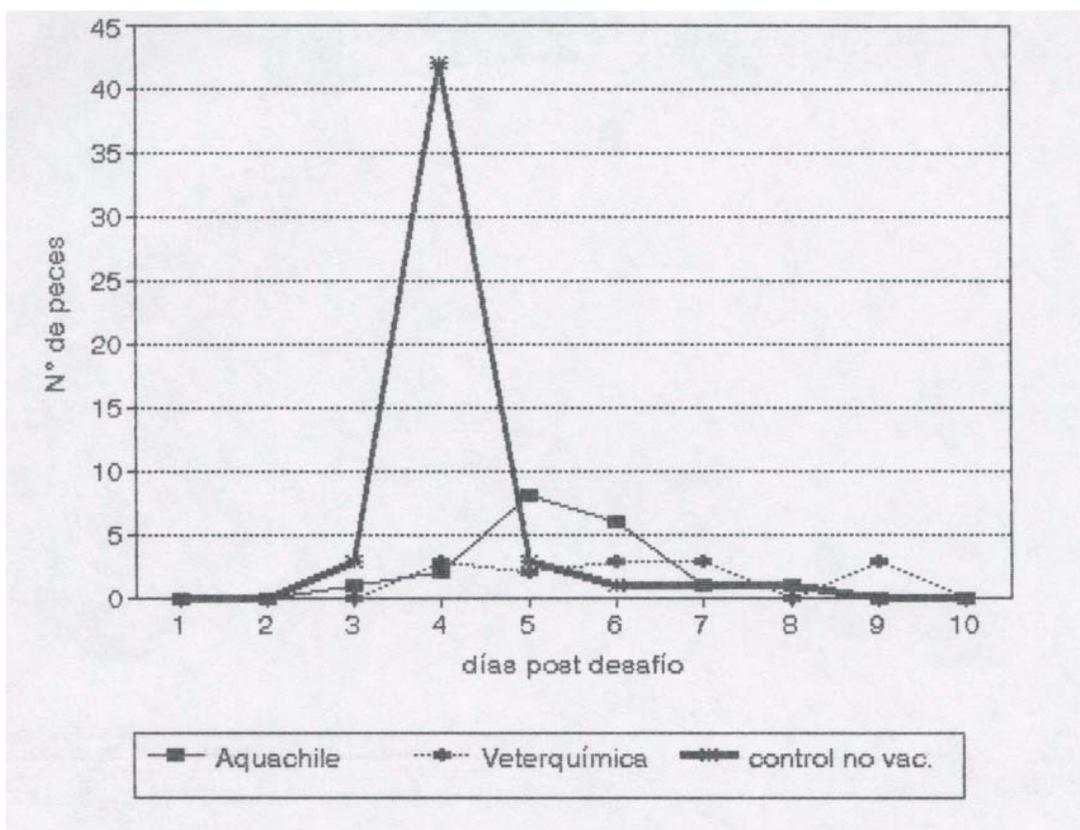


Gráfico N°1: Mortalidades diarias por Yersiniosis, de tres grupos de S. salar desafiados con cepa atípica.

-Se puede observar que el grupo control alcanzó el pick de mortalidad diaria el día 4 post desafío para luego caer y detenerse el día 8 post desafío.

-El grupo vacunado Aquachile tuvo su pick de mortalidad diaria el día 5 post desafío, para luego descender hasta el día 8.

-El grupo vacunado Veterquímica mostró mortalidades diarias bajas pero sostenidas hasta el día 9 post desafío.

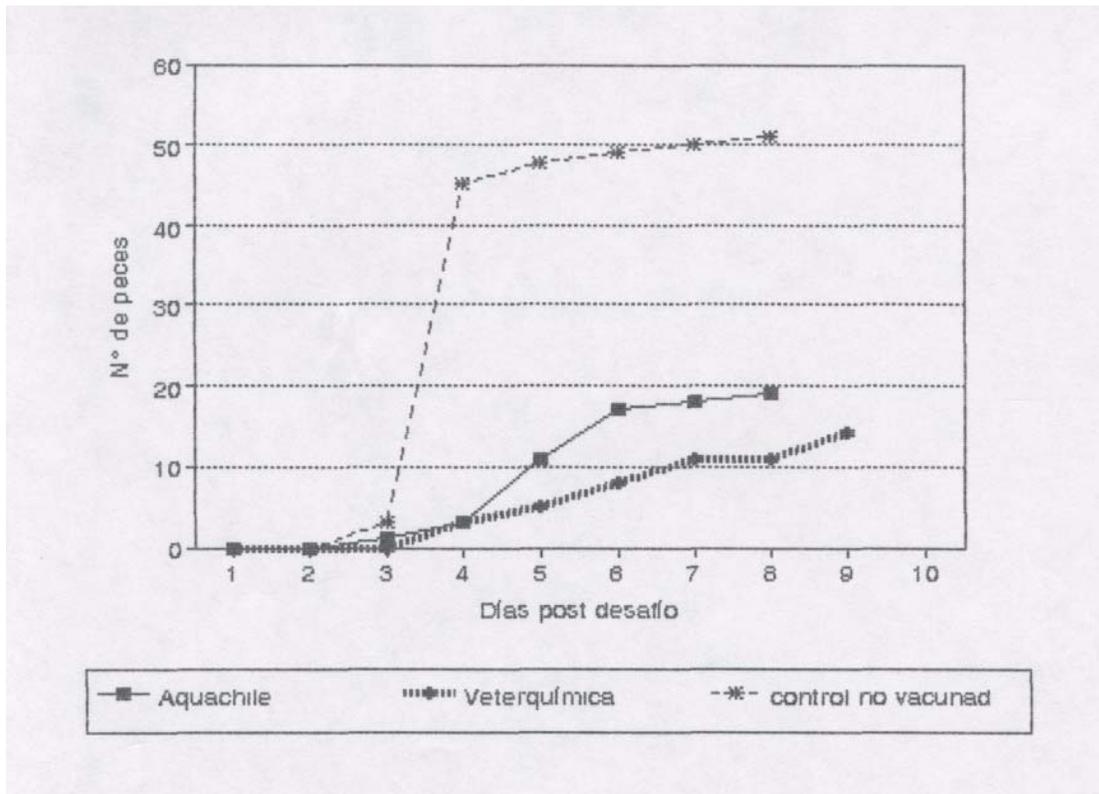


Gráfico H°2: Mortalidades acumuladas por Yersiniosis de tres grupos de S. salar desafiados con cepa atípica.

-Se puede observar que la mortalidad comenzaron a manifestarse en dos grupos a partir del día 3 post desafío, excepto el grupo vacunado Veterquímica que comenzó el día 4.

-A su vez el grupo control el día 4 post desafío alcanzó una mortalidad de 42 peces, que prácticamente correspondieron al 75% de este grupo.

5.2 Examen anatomopatológico

Se presentaron alteraciones anatomopatológicas externas tales como hemorragia bucal, hemorragias en la base de las aletas especialmente en las pectorales y anal, exoftalmia, hemorragia periocular, palidez branquial, y hemorragia anal. Internamente las alteraciones correspondieron a hemorragias petequiales en grasa visceral, hígado hemorrágico o pálido y mucosidad amarilla en intestino.

5.3 Examen bacteriológico

A partir de las muestras obtenidas de cada pez muerto fue posible observar crecimiento bacteriano en medio de cultivo TSA. De las colonias sospechosas: de aspecto circular o levemente onduladas, de 1 a 3 milímetros de diámetro, blancas, opacas, de elevación convexa, superficie lisa y de borde entero, se realizaron tinciones de Gram, observándose la presencia de bacilos Gram -. Las pruebas de oxidasa resultaron negativas, la prueba de motilidad indicó que se trataban de bacterias inmóviles, y la prueba de aglutinación rápida en placa con antisuero de **Y. ruckeri** tipo I dio positividad. Las muestras cuyo crecimiento de colonias no se ajustaban a las características anteriormente expuestas y en las cuales a partir de los Gram de riñón, cerebro, hígado y bazo no fue posible observar la presencia de bacilos Gram -, se consideraron como mortalidades inespecíficas y no se incluyeron dentro del análisis.

5.4 Cálculo del RPS

Las variables para el cálculo de porcentaje relativo de supervivencia (RPS) de cada uno de los grupos testeados fue el siguiente:

- Porcentaje de mortalidad grupo vacunado A (Aquachile): 31,6 %
- Porcentaje de mortalidad grupo vacunado B (Veterquímica): 24 %
- Porcentaje de mortalidad grupo no vacunado C (CONTROL) : 91 %

Cálculo de RPS Aquachile :

$$\left[\frac{1 - 31,6}{91} \right] * 100$$

RPS : 65,27 %

Cálculo de RPS Veterquímica :

$$\left[\frac{1 - 24}{91} \right] * 100$$

RPS 73,62 %

5.4.1 Análisis bioestadístico de RPS

Para los valores RPS obtenidos en el experimento, el método de independencia entre dos valores porcentuales indica que el valor obtenido ($X^2 = 0,5925$) es menor a ($X^2 = 3,841$ con un grado de libertad al 0,05%), por lo tanto se acepta la hipótesis de que en las mortalidades no tiene mayor relevancia el uso de dos vacunas diferentes.

5.4.2 Medición de anticuerpos

Los resultados del ELISA practicado a suero de peces que sobrevivieron a la fecha de término del experimento, corresponden a pools de sueros de peces eutanizados, que no mostraron lesiones por Yersiniosis y de los cuales no fue posible aislar la **Y. ruckeri** post desafío, además de utilizar suero control de peces no vacunados no desafiados.

Tabla N°2: Lecturas de absorvancia de los peces vacunados Aquachile y Veterquímica sobrevivientes al desafío con la cepa atípica de **Yersinia ruckeri** y un grupo de peces control no vacunado no desafiado.

dilución	Aquachile	Veterquímica	Control (-)
1:10	0,698*	0,624	0,380

(*) absorvancia a 492 nm

6. DISCUSIÓN

En Chile a partir de 1982, se podría decir que tomamos un contacto registrado y luego publicado con **Yersinia ruckeri**, aislada en el río Valdivia desde carpas silvestres (*Cyprinus carpio*) asintomáticas (Enríquez y col., 1987), y en el verano 1991 a 1992 ocurren los primeros brotes con mortalidad específica por el agente en salmón del atlántico (*Salmo salar*), algo diferente a lo que ocurre con el hemisferio norte donde la especie generalmente afectada por la ERM es la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). En 1994 se hacen presente cepas atípicas de **Y. ruckeri** (inmóvil y resistente al ácido oxolínico) y para 1996 nos encontramos ya con cepas multirresistentes en el medio nacional (Madrid, 1996. Comunicación personal)⁹.

Esto pone de manifiesto que los estudios realizados no permiten dilucidar aún todas las variantes antigénicas de **Y. ruckeri** de los aislados locales. La variabilidad antigénica observada en los aislados nacionales de **Y. ruckeri** reafirma la necesidad de una constante vigilancia de la composición bioquímica y serológica de esta bacteria, para que la acción protectora de las vacunas siga siendo adecuada (Jaureguiberry, 1996. Comunicación personal)⁵.

En la actualidad el método de vacunación de elección es el de inmersión que se basa en la exposición del pez al antígeno y su absorción por las branquias, en cierto grado por imbibición y a través del agua de bebida (Zapata y col., 1987).

Existen dos variaciones de este método : la inmersión rápida y el baño. La primera consiste en traspasar los peces de sus estanques a un recipiente más pequeño que contiene la vacuna diluida, las diluciones que se utilizan son de 1:3, 1:10 ó 1:100 con un tiempo de exposición que varía entre 20 y 60 segundos. La densidad recomendada es de 450 gramos de peces por litro de vacuna diluida (Ellis, 1988). El baño consiste en diluir la vacuna directamente en los estanques, por lo tanto no requiere manipulación de los peces. Sin embargo, se requiere mayor cantidad de vacuna. La dilución utilizada es de 1:500 ó 1:5000 y el tiempo de exposición es de una hora o más (Ellis, 1988). En Chile se utilizan vacunas nacionales e importadas, usando el baño como una de las vías de aplicación.

En este estudio, como se puede observar en la tabla N°1, la mortalidad del grupo vacunado por Aquachile llegó al 31,6 %, el grupo vacunado con vacuna de Veterquímica mostró una mortalidad del 24%, porcentajes que se ajustan en cierta medida a lo

⁵ E. Madrid y B. Jaureguiberry. Curso de Capacitación Inmunología y Vacunación de Salmones y Truchas. Puerto Montt, 24 y 25 de Septiembre de 1996.

esperado para un desafío considerado como positivo. Otros ensayos realizados por otros autores en truchas arcoiris observaron un 18% de mortalidad por ERM en truchas de 9,5 gramos vacunadas, desafiadas con una concentración bacteriana de $4,6 \times 10^8$ bacterias/ml (Johnson y Amend, 1983b). Briones, (1995) que utiliza salmón del atlántico desafía peces vacunados de 10 gramos, con una concentración bacteriana $3,7 \times 10^6$ bacterias/ml por un tiempo de exposición de 60 segundos registrando una mortalidad de 0.

El grupo control (no vacunado) mostró una mortalidad del 91%, que prácticamente se expresó al cuarto día post desafío algo muy similar a lo expuesto por Briones, (1995), quien utilizando una alta concentración 10^8 bacterias/ml, por un tiempo de exposición de 60 minutos, obtuvo una mortalidad del 100% en 48 horas. Bullock, (1976) utilizando salmón del atlántico, desafiados con una concentración de 10^7 células/ml con un tiempo de exposición de 30 minutos, obtuvo una mortalidad de 30-50%, Bullock, (1984), utilizando truchas arcoiris de 10 gramos, desafiadas con una concentración 10^8 - 10^9 células/ml por 90 segundos, obtuvo una mortalidad de 65-95% a los 14 días.

La variación de las mortalidades de los tres grupos, con respecto a lo planteado por los autores anteriores, puede verse explicada primero por la especie utilizada para estos ensayos. La especie utilizada generalmente es la trucha arcoiris que es la que presenta mayor susceptibilidad en el hemisferio norte. Respecto de la cepa de **Y. ruckeri** utilizada también fue diferente. Briones (1995) utilizó la cepa típica cuya dosis LD50 es de $3,7 \times 10^6$ bacterias/ml. La concentración bacteriana del desafío de esta experiencia, fue de $1,2 \times 10^7$ bacterias/ml, la LD50 para la cepa atípica aún no se determina, posiblemente podría ser más patógena. Se ha planteado que las altas concentraciones del agente patógeno podrían tener un efecto tóxico en el salmón del atlántico (Briones, 1995). El tiempo de exposición a la bacteria es otra variable muy inconstante en cada estudio, para este caso el tiempo de exposición fue de 30 minutos lo que evidentemente conlleva a que los peces tengan más posibilidades de tener un amplio contacto con el agente. Otra variable es la duración del experimento ya que a los 10 días post desafío se dio por terminado el experimento, para evitar la reinfección, puesto que para este tipo de desafío se considera como máximo 14 días de duración (Ellis, 1988).

La temperatura del medio ambiente también influencia los procesos metabólicos de los peces, incluso del sistema inmune, algunos experimentos realizados en salmón coho y carpas demuestran que las bajas temperaturas tienen influencia directa sobre el período de latencia, es decir que los anticuerpos son diagnosticados más tardíamente (Fariás, 1995); a su vez las altas temperaturas permiten una mejor respuesta del sistema inmune hasta ciertos límites, sobre los 18 °C se produce un estrés

térmico que afecta directamente la respuesta inmune. El bajo porcentaje de saturación de oxígeno en el agua aunado a un rápido aumento de la flora oportunista en el medio acuático, como por ejemplo hongos del tipo saprolegnia, empiezan a tener un efecto negativo en la salud de los peces (Fariás, 1996. Comunicación personal) ⁶. En este experimento el rango de temperatura fluctuó entre 18-19 °C.

La contaminación del medio acuático tiene también su efecto, la respuesta inmune frente al antígeno-0 de **Y. ruckeri** se ve significativamente reducida en presencia de agua contaminada durante la inmunización a través del baño. Algunos elementos químicos han sido también asociados influenciando los mecanismos de defensa de los peces. Las partículas de carbono del tipo aromático tienden a reducir la actividad quimiotáctica en los peces y la capacidad fagocítica de los macrófagos (Fariás, 1995). Medios acuáticos con una alta proporción de amonio y otros metabolitos tuvieron efecto en la alta presentación de la ERM informada por Bullock y Snieszko (1979). Para nuestra experiencia el hecho de tener un sistema de recirculación interna, de alguna manera expuso a los peces a los patógenos presentes en el medio por mayor tiempo, contrario a un sistema de circulación continua en donde existe la posibilidad de remoción de patógenos por arrastre físico.

El cuadro anatomopatológico en la mayoría de los peces muertos fue evidentemente atribuible a Yersiniosis, el hecho de que fuera posible observar lesiones tales como hemorragias bucales, hemorragias oculares, hemorragia en la base de las aletas, ano hiperhémico, y las lesiones internas : hemorragias Petequiales en grasa visceral y contenido mucoso amarillento en el intestino, descrito por distintos autores, hizo en si más fácil el poder determinar las causas de las mortalidades en los peces. Destacable es el hecho que generalmente estas lesiones no son tan evidentes en los brotes en terreno, quizás la cepa atípica de **Y. ruckeri** sea más patógena, o por las concentraciones del desafío se tiendan a expresar con mayor facilidad las lesiones descritas en la literatura. Se confirmaron que estas lesiones correspondieron al agente patógeno a través de su reaislamiento a partir de cultivo en medio TSA, su confirmación bioquímica y serológica.

Se pudo a su vez establecer, que no se encontraron estados portadores en ninguno de los peces de los grupos vacunados que sobrevivieron a la fecha de término de la experiencia, esto es al día 10 p.i.. Sin embargo, se debe destacar que los primeros 30 días post infección **Y. ruckeri** se aloja tanto en riñón como en

⁶ C. Fariás, Ictiopatología. Universidad Austral de Chile. Comunicación Personal, 1996.

bazo, hígado, cerebro e intestino posterior, localizándose a contar de los 60 días sólo en intestino posterior produciendo un ciclo de eliminación a través de fecas de 3-5 días cada 36-40 días (Inglis y col., 1983).

La alta mortalidad del grupo control no vacunado tuvo su efecto en los RPS los cuales tendieron a ser bajos, en este sentido para su cálculo se prefiere el uso de una dosis letal 50, sin embargo se logró hacer una diferenciación entre ambas vacunas, la RPS del grupo vacunado Veterquímica fue superior a la del grupo vacunado por Aquachile en un 8,4%. Pero el análisis estadístico permite inferir que esta diferencia no es significativa.

Con respecto al ELISA realizado, conviene señalar que, por el hecho de no contar con un sistema previamente estandarizado, estos resultados no pasan de ser simplemente lecturas de absorvancias. Necesariamente se debe tener un procedimiento de calibración, considerando valores remitidos de peces vacunados no desafiados, peces no vacunados inoculados con **Y. ruckeri** y peces comprobadamente sanos.

Se pudiera agregar que los títulos de los peces vacunados tendieron a ser bajos (Tabla N°2) y esto podría estar relacionado con la labilidad de las IgM de los peces a diferencia de los mamíferos, algunos manejos simples del suero obtenido de los peces como por ejemplo, el descongelar y volver a congelar podría traer como consecuencia un descenso en los títulos de anticuerpos del orden del 80% (Adams, 1996. Comunicación personal)⁷.

El grupo control no vacunado no desafiado mostró absorvancias mayores a las esperadas (Tabla N°2) (Fariás, 1995), esto pudiera explicarse por dos razones: un ineficiente bloqueo de la placa de ELISA o por que los peces tuvieron contacto previo con **Y. ruckeri**.

⁷ A. Adams. Curso de Capacitación Inmunología y Vacunación de Salmones y Truchas. Puerto Montt, 24 y 25 de Septiembre de 1996.

Las condiciones especiales y particulares que se manejan y otras variables que son imposibles de controlar, hacen en sí de esta experiencia un aporte más a otros estudios, para que en conjunto los interesados se formen una idea de las reales posibilidades que tienen en el mercado a la hora de tomar una decisión para el control de la Yersiniosis.

Bajo las condiciones del presente estudio se concluye que:

-La alta mortalidad del grupo control tuvo su efecto en los RPS de las vacunas de Aquachile y Veterquímica que resultaron menores de lo esperado.

-El RPS de la vacuna de Veterquímica fue superior al RPS de la vacuna de Aquachile en un 8,4%, sin embargo esta diferencia no es significativa estadísticamente.

-Las vacunas testeadas de Veterquímica y Aquachile bajo el método RPS, protegen contra la cepa atípica de **Yersinia ruckeri**.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALVARADO, V., J.W. SCHAFER, R. ENRIQUEZ y M. HONRAS.** 1990. Salmonicultura en Chile. Estado actual, proyecciones y estado sanitario. *Revista del Medio Ambiente* 11(1): 9-14.
- ARKOOSH, M.R. y S.L. KAATTARI.** 1990. Department of Microbiology, Oregon State University. Techniques in Fish Immunology. pp 15-24.
- AUSTIN, B y D.A. AUSTIN.** 1987. *Yersinia ruckeri* In Bacterial Fish Pathogens: disease in farmed and wild fish. John Willey and Sons, New York. 207-224.
- BARJA, J.L. y A.E. TORANZO.** 1988. Infecciones causadas por Enterobacterias. Patología en Acuicultura. CAICYT. Madrid, España, pp 501-505.
- BRAVO, S.** 1993. Diseases Reported in Pen Reared Salmonids from Chile. FHS/AFS Newsletter 21(3);3.
- BRIONES, L.** 1995. Inmunización de salmón del atlántico (*Salmo salar*) con una bacterina de *Yersinia ruckeri* por el método de inmersión. Tesis M.V., Universidad Austral de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias, Valdivia, Chile.
- BULLOCK, G.L., H.M. STUCKEY y R.L. HERMAN.** 1976. Comparative susceptibility of atlantic salmón (*Salmo salar*) to the enteric redmouth bacterium and *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Wildlife Diseases*. 12: 376-379.
- BULLOCK, G.L. y S.F. SNIESZKO.** 1979. Enteric redmouth disease of salmonids. Fish Disease Leaflet NQ57. U.S. Fish and wildlife Service, Washington, D.C.
- BULLOCK, G.L., E.G. SHOTTS Jr. y STARLIPER.** 1981. Biochemical, serological and virulence studies with *Yersinia ruckeri*. Annual Fish Health Sec. 6: 53-54.
- BULLOCK, G.L. y D.P. ANDERSON.** 1984. Immunization against *Yersinia ruckeri*, cause of enteric redmouth disease. In Symposium of Fish Vaccination (Ed. by de Klinkelin), pp 151-156. Office International des Epizooties, Paris.
- BUSCH, R. y A.J. LINGG.** 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of ERM in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Res. Board Can. 32(12):2429-2432.
- BUSTOS, P.** 1993. Nuevo Desafío para la Acuicultura. Aquanoticias Internacional. 16:53.
- DALY, J.G., B. LINDVIK y R.M.W. STEVENSON.** 1986. Serological

heterogeneity of recent isolates of **Yersinia ruckeri** obtained from wide geographical areas. J. Fish Dis. 12:357-365.

DAVIES, R.L. y G.N.FRERICHS. 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of **Yersinia ruckeri** from Ontario and British Columbia. Dis. Aquat. Org. 1:151-153.

DAVIES, R.L. 1990. O-Serotyping of **Yersinia ruckeri** with special emphasis on European Isolates. Vet. Microbiol. 22:299-307.

DEAR, G. 1988. **Yersinia ruckeri** isolated from atlantic salmon in Scotland. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 8(2); 18-20.

ELLIS, A. 1988. Fish Vaccination. 3^a ed., Academic Press. Londres.

ENGWALL, E y P. PERLMAN. 1972. Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Quantitation of specific antibodies by Enzyme-Labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109:128-135.

ENRIQUEZ, R. y J. ZAMORA. 1987. Aislamiento de **Yersinia ruckeri** de carpas (*Cyprinus carpio*) en Valdivia. Arch. Med. Vet. 19 (1): 33-36.

EWING, W.H., A.J. ROSS, D.J. BRENNER y G.R. FANNING. 1978. **Yersinia ruckeri** sp nov., the redmouth (RM) bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 37-44.

FARIAS, C. 1995. Immunological studies on *Renibacterium salmoninarum*, the etiological agent of the Bacterial Kidney Disease. Phd. Thesis. University of Stirling, Escocia, U.K.

FUHRMANN, H., K.H. BOHM y H.J. SCHLOTFELDT. 1983. An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. J. Fish Dis. 6:309-311.

HUNTSBERGER, D.V. 1967. Elements of Statistical Inference. Ed. Allyn and Bacon, Boston Mass.

INGLIS, V., R. ROBERTS y N. BROMAGE. 1983. Bacterial Diseases of Fish. 1^a ed., Blackwell Scientific Publications.

JOHNSON, K.A. y D.F. AMEND. 1983a. Comparison of several delivery methods usings **Yersinia ruckeri** bacterin on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. J. Fish Dis. 6: 331-336.

JOHNSON, K.A. y D.F. AMEND. 1983b. Efficacy of *Vibrio Anauillarum* and **Yersinia ruckeri** bacterins applied by oral and anal intubation. J. Fish Dis. 6:473-476.

KINZEL J.K. 1995. Estudio de la patogenia de **Yersinia ruckeri** mediante inoculación experimental en *Salmo salar*. Tesis M.V., Universidad Austral de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias, Valdivia,

Chile.

LOPEZ, R.F. 1996. Aislamiento y Prevalencia de **Yersinia ruckeri** en Salmo salar en el estuario de Reloncaví. Tesis M.V., Universidad Austral de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias, Valdivia, Chile.

MACAYA, A. 1994. Octava Asamblea de la APSTCH. Aquanoticias Internacional. 21:18-23.

MENDEZ, R.S. 1995. Cosechas anuales de especies de cultivos. Aquanoticias Internacional. 1:7-17.

MENDEZ, R. y C.MUNITA. 1989. La salmonicultura en Chile, ed. Ricardo Cortés. Santiago, Chile, pp 229.

OLESEN, N.J. 1991. Detection of antibody response in rainbow trout following inmersión vaccination with **Yersinia ruckeri** bacterins by ELISA and passive immunization. J. Appl. Ichthyol. 7:36-43.

POST, G. 1987. Textbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. U.S.A. pp 47-51.

REYES, X. 1983. Rol de enfermedades en el desarrollo de los cultivos intensivos de salmonideos. Análisis de pesquerías chilenas. Valparaíso, pp 47-53.

REYES, X. 1985. Bases técnicas para la formulación de un control sanitario en los cultivos de salmonideos. En: **MELO, T.** Estudio de pesquerías chilenas Escuela de Ciencias del Mar, U.C.V, Valparaíso, pp 62-69.

RODGERS, C.J. 1991. The control of enteric redmouth disease in fish. Trout News 12:27-30.

ROSS, A.J. y G.H. KLONTZ. 1965. Oral immunisation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiological agent of "Redmouth Disease". Can. J. Microbiol. 22; 763-770.

ROSS, A., R.R. RUCKER y W. EWING. 1966. Descriptions of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Microbiol. 12:763-770.

RUCKER, R.R. 1966. Redmouth Disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bull. Off. Int. Epiz. 65: 825-830. Citado por WOBESER, G. 1973. an outbreak of redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. J. Fish. Res. Board Can. 30:571-575.

SCHAFFER, M., V. ALVARADO, R. ENRIQUEZ y M. MONRAS. 1990. The Coho Salmon Syndrome (CSS): a new disease in Chilean salmon reared in

sea water. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 10:130.

STEVENSON, R.M.W. y J.G. DALY. 1982. Biochemical and Serological Characteristics of Ontario isolates of **Yersinia ruckeri**. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38:870-876.

TEBBIT, G.L., J.D. ERICKSON y R.B. VANDEWATER. 1981. Development and use of **Yersinia ruckeri** bacterins to control enteric redmouth disease. Dev. biol. standard. 49: 395-401.

ZAPATA, A.G., M.TORROBA, F. ALVAREZ, D.P. ANDERSON, O.W. DIXON y M. WISNIEWSKI. 1987. Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunisation with a bacterin. J.Fish Biol. 31: 209-217.

ANEXO

Soluciones para Test de ELISA.1. Solución tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,2)

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	9,28 gr
KH ₂ PO ₄	2,15 gr
NaCl	36,10 gr
H ₂ O dest. c.s.p.	1000,00 ml
solución preparada al 5x y guardada a 4°C.	

2. solución tampón de pegada 0,08 M (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃	1,59 gr
NaHCO ₃	2,93 gr
H ₂ O dest. c.s.p.	1000,00 ml
preparada en fresco y guardada a 4 °C.	

3. Solución bloqueadora tween 20

Tween 20	0,5 %
H ₂ O dest. c.s.p.	100,00 ml

4. Solución de lavado (TPBS)

Tween 20	0,05 %
PBS c.s.p.	100,00 ml

5. solución de revelado

Ortofenildiamina	0,004 %
H ₂ O ₂	0,0012 %
Ac. cítrico	0,100 M
NaH ₂ PQ	0,200 M
H ₂ O c.s.p.	10,000 ml

6. Solución de parada (2f5 M)

H ₂ SO ₄ conc.	18,00 M
H ₂ O c.s.p.	100,00 ml

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente a todos aquellos quienes permitieron la realización de este estudio, especialmente al Dr. Ricardo Enriquez S., profesor patrocinante por su paciencia, consejo y conducción de este trabajo.

Al Dr. Hugo Folch y Mónica Honras, por su colaboración en el desarrollo práctico de esta tesis.

Al Dr. Carlos Farias, por su buena disposición y consejos sabios en los momentos difíciles.

Al Sr. Esteban Henriquez, auxiliar del Instituto de Ictiopatología por su buena disposición.

A la Sra. Mónica González, secretaria del Instituto de Ictiopatología, por su paciencia, comprensión y cariño que siempre contribuyeron a mantener la armonía de trabajo.

A los tesisistas por su compañerismo.

Y a todos aquellos amigos y personas quienes de una u otra forma fueron un aporte humano a la realización de esta investigación.