



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

Determinación de la Susceptibilidad de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*),
Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)
a un agente semejante a Rickettsia (U2) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*)

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

Pedro Eduardo Cárdenas Villarroel
Valdivia Chile 1998

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enriquez
Nombre


Firma

COLABORADOR

Sra. Mónica Monrás (Tec. Medico)
Nombre


Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Enrique Paredes H.
Nombre


Firma

Dr. Justo Zamora
Nombre


Firma

FECHA DE APROBACION:

3 de Diciembre de 1998

A MIS PADRES

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODO	7
RESULTADOS	10
DISCUSION	18
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFIA	24
ANEXOS	27

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la susceptibilidad de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) a la inoculación intraperitoneal (i.p.) de U2, un agente semejante a Rickettsia (RLO) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) colectado del Lago Llanquihue.

El material de la investigación estuvo constituido por 47 Salmones del Atlántico, 47 Salmones Coho y 44 Truchas Arcoiris. Además se mantuvo un grupo control con 15 peces (5 S. del Atlántico, 5 S. Coho y 5 T. Arcoiris), todos mantenidos en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

La totalidad de los peces fueron inoculados simultáneamente el día 7 de Agosto de 1998, con 0.1 ml de U2 aislado de Puye en dosis de 10^2 TCID₅₀ / pez vía i.p, el grupo control también fue inoculado con 0.1 ml de medio de cultivo de células (MEM) vía i.p. Se determinó la presencia del agente rickettsial aplicando los Postulados de Koch.

Sólo se pudo realizar un esquema de trabajo en Salmones del Atlántico ya que fue la única especie en la cual se presentaron signos clínicos y mortalidad asociada, en cambio en el grupo experimental de S. Coho y T. Arcoiris se procedió a sacrificar 8 a 10 peces diarios de cada grupo 30 días post-inoculación, el grupo control se sacrificó al final del ensayo.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que todos los S. del Atlántico murieron, comprobando mediante los postulados de Koch que el organismo aislado era el causante de la enfermedad. La signología clínica interna se caracterizó por ser hemorrágica. El diagnóstico histopatológico de *Salmo salar* en este estudio es: Hepatitis necrotizante multifocal; Nefritis intersticial y túbulonefrosis; Esplenitis difusa. Microscópicamente las improntas de hígado, bazo y riñón teñidos con Gram, presentaron formas cocoides, gram negativas, de tamaño muy pequeño de 0.2 a 0.8 μ m de diámetro, en cúmulos intra y extracelulares. La tinción de Giemsa de los frotis de sangre reveló presencia de cúmulos cocoides en el citoplasma de macrófagos, además de eritrocitos inmaduros.

El agente rickettsial pudo ser aislado y titulado desde S. del Atlántico alcanzando un título de 10^6 TCID₅₀ / g de tejido. Además se visualizó una fluorescencia (IFAT - U2) específica de las formas cocoides intra y extracelulares en niveles de 1500 a 10000 U2/100 CMD (Campos microscópicos).

Los resultados permiten concluir que la especie salmonídea susceptible a la inoculación intraperitoneal de U2 (RLO) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) es el Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

2. SUMMARY

The objective of the present work was to determine the susceptibility of Atlantic Salmon (*Salmo salar*), Coho Salmon (*Oncorhynchm kisutch*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the intraperitoneal inoculation (i.p.) of the rickettsia like-organism named U2, originally isolated from Puye fish (*Galaxias maculatus*) in the Llanquihue Lake.

The sample material was 47 Atlantic Salmon, 47 Coho Salmon and 44 Rainbow Trouts. A control group containing 5 fish of each specie was also set up. All groups were kept in the Laboratory of Ictiopatology of the Universidad Austral de Chile.

All fish were inoculated i.p. simultaneously, with 0.1 ml a puye isolated U2 at 10^2 TCID₅₀/ fish, control group received only 0.1 ml i.p. of Culture Medium (MEM). The presence of the rickettsial agent was determined the by Koch' Postulates.

Clinical signs and associated mortality, was observed, only in Atlantic Salmon. The experimental group, Coho Salmon and Rainbow Trout were sampled daily taking 8-10 fish / day until the 30th day post inoculation. Control group was killed at the end of the study.

The results obtained in this study showed that all Atlantic Salmon inoculated with the pathogen died. This allows to fulfill the Koch's Postulate and confirmed that the isolated organism from puye fish was the cause of the disease. The clinical signology was characterized as haemorrhagic. The histopathology analysis of *Salmo salar* showed multifocal necrotic hepatitis, interstitial nephritis and tubular nephrosis, diffuse splenitis. Microscopically the imprintig of liver, spleen and kidney stained with Gram, showed intra a extracellular gram negative cocoid organism of 0.2 to 0.8 um in diameter. The Giemsa stain of blood smear revealed the presence of cocoid structures in the cytoplasm of macrophage cells and also juvenile eritrocytes.

We were able to isolate a rickettsia like-organism (U2) from Atlantic Salmon at 10^6 TCID₅₀/ g of tissue. The fluorescence test (IFAT / U2) specifically identified the intra and extracellular cocoid organisms at 1500 to 10000 U2/ 100 CMD (microscopic Fields).

The results of this research allow us to conclude that the only salmonid species susceptible to the i.p. inoculation of U2, isolated of Puye (*Galaxias maculatus*), was Atlantic salmon (*Salmo salar*).

3. INTRODUCCION

La salmonicultura nacional es una de las actividades productivas más importantes en el sur de Chile, con un crecimiento del orden del 26 % respecto del año anterior, la producción de salmón y trucha para la temporada 1994 - 1995 superó las 100.000 ton, generando divisas por US\$ 348 millones (Méndez, 1995). Así, Chile se mantiene como el segundo país productor de salmón en confinamiento (Méndez y Vidal, 1994; Méndez, 1995). Esto ha llevado a que en la actualidad Chile haya superado los US\$ 540 millones en divisas durante la actual temporada (Méndez, 1997).

Esta actividad se ha desarrollado en forma sustentable debido a las excelentes condiciones hidrológicas del sistema acuático nacional; la inversión estacional de los hemisferios que permite la captación del mercado internacional en épocas de menor competencia; además los costos de inversión y producción comparativamente más bajos que aquellos países de tradición salmonera (Méndez y Munita, 1989; Alvarado y col. , 1990 a). La costa de la Xª Región se caracteriza por la gran cantidad de fiordos y bahías protegidas del viento lo que hace que ese sector del Océano Pacífico sea un lugar muy adecuado para la instalación de balsas jaulas destinadas al cultivo de salmonídeos. Las temperaturas del agua oscilan entre 10° y 15° C con salinidad promedio de 20 a 30 por mil (Alvarado y col., 1990 a).

La exportación y comercialización de los productos marinos esta sometida a estrictas normas de los mercados importadores que exigen calidad, tanto de tipo morfológico como sanitario. Las enfermedades de los peces, causantes de las principales alteraciones organolépticas, no tienen una sola causa, sino que son producto de la interacción continua entre el medio ambiente acuático, el pez y el agente patógeno. Mientras estos factores estén en equilibrio el resultado es un pez saludable y de buen crecimiento. Sin embargo, pueden existir factores que lleven a un desequilibrio presentándose alteraciones que afectan al estado general del pez (Fox, 1984).

La histórica situación privilegiada respecto a la ausencia de enfermedades en las poblaciones de peces en cultivo, se ha ido perdiendo paulatinamente (Méndez y Vidal, 1994).

Durante la temporada 1991 - 1992 la mortalidad promedio nacional entre la etapa de incubación a la cosecha alcanzó el 61% (Bustos, 1993; Méndez y Vidal, 1994). Bustos (1993) estima que el 42 % de estas pérdidas fueron originadas por enfermedades bacterianas, con un impacto económico de aproximadamente US\$ 143 millones (Precio FOB 1991). Señala además que para la temporada 1993 - 1994 este porcentaje aumentará a un 45 %, básicamente por el impacto de la Yersiniosis y la creciente severidad de la Septicemia Rickettsial Salmonídeo.

Las enfermedades que provocan las mayores pérdidas en Chile, son la Septicemia Rickettsial Salmonídea (S.R.S: Salmonid Rickettsial Septicemia) y la Enfermedad Bacteriana del Riñón (B.K.D: Bacterial Kidney Disease) (Bustos, 1993).

LA SEPTICEMIA RICKETTSIAL SALMONÍDEA (SRS: Salmonid Rickettsial Septicemia) es una enfermedad de curso insidioso que afecta a los salmonídeos en cultivo, se presenta en forma aguda o crónica dependiendo de la especie y condición ambiental imperante (Bustos y col., 1994). Clínicamente se define como una enfermedad septicémica, granulomatosa y proliferativa del riñón y bazo, con necrosis focales del tejido hepático y hemorragias de las fibras musculares (Alvarado y col., 1990b).

Esta enfermedad se observa en salmones cultivados durante la fase marina principalmente en Otoño y Primavera, cuando la temperatura del agua oscila entre 9 y 16 °C (Bravo y Campos, 1989; Cubillos y col., 1990; UACH/UCV, 1992). Recientemente ha sido descrita en fase de agua dulce (Bravo, 1994 a, b; Gaggero y col., 1995).

En los tejidos afectados se aprecian microorganismos gram negativos, cocoides (a menudo pleomórficos) de 0.5 a 1.5 μ m de diámetro (Bravo y Campos, 1989; Alvarado y col., 1990 b; Fryer y col., 1990; Gárate, 1990, Schäfer y col., 1990; Fryer y col., 1992). Este agente se ubica tanto extra como intracelularmente en células del sistema fagocítico mononuclear (sistema retículo endotelial) y en ocasiones en el citoplasma de células hepáticas (Cubillos y col., 1990; UACH/UCV, 1992). In vitro este se multiplica por fisión binaria en vacuolas o inclusiones intracitoplasmáticas en líneas celulares de peces, alcanzando un desarrollo óptimo entre los 15°C a los 18°C (Fryer y col., 1990; Lannan y Fryer, 1993).

La ubicación taxonómica de este microorganismo es en el orden Rickettsiales, familia Rickettsiaceae (Cvitanich y col., 1990). Fryer y col. (1992) proponen un nuevo género y especie *Piscirickettsia salmonis gen. nov., sp. nov.*

La cepa de *P. salmonis*, aislada en el sur de Chile, fue designada LF-89 e inscrita en American Type Culture como ATCC VR 1361 (Fryer y col., 1990). Desde entonces, agentes morfológicamente similares han sido detectados en salmónidos de diferentes áreas geográficas (Fryer y Lannan, 1994). Uno de estos organismos fue identificado en el año 1991 en salmones del atlántico y chinook, en British Columbia, Canadá (Brocklebank y col., 1992; Kent, 1992, Brocklebank y col., 1993). Este agente posee uno a más antígenos comunes con *P. salmonis*, pero de una virulencia menor que la cepa tipo LF-89 (Lannan y Fryer, 1994). En Irlanda se observó a través de microscopía electrónica, un organismo tipo rickettsia en salmones del atlántico (Rodger y Orinan, 1993). Si bien, estos agentes tipo rickettsia producen patologías similares a las desarrolladas en Chile, los niveles de mortalidad alcanzados son muy bajos comparados con las pérdidas en nuestro país (Kent, 1992; Brocklebank y col., 1992; Brocklebank y col., 1993; Rodger y Drinan, 1993).

El modo de transmisión así como la fuente de infección de *P. salmonis* no ha sido claramente identificada (Lannan y Fryer, 1993; Lannan y Fryer, 1994). Tanto en forma experimental como en terreno se indica la existencia de una transmisión horizontal del agente en el ambiente salino, sin la presencia de vectores (Cvitanich y col., 1990, Gárate, 1990; Branson y col., 1991; Bravo y Gutiérrez, 1991; Bravo, 1994 a; Lannan y Fryer, 1994). Lannan y Fryer (1994) señalan la escasa sobrevivencia de *P. salmonis* en el agua dulce que imposibilitaría la transmisión horizontal directa en este medio. En relación a una posible transmisión vertical, Bravo (1994 a, b) y Gaggero y col. (1995) la indican como una de las posibles causas de los brotes de S.R.S. reportados en agua dulce.

La importancia de ésta patología radica en las enormes pérdidas económicas que origina, alcanzando mortalidades acumuladas hasta cosecha de un 60 a 80 % en S. coho (Bravo y Campos, 1989; Alvarado y col., 1990 b; Cubillos y col., 1990; Schäfer y col., 1990).

Cuando el cuadro rickettsial estaba caracterizado en sus aspectos epidemiológicos, clínicos y patológicos, en los meses de Diciembre de 1994 y Enero de 1995, se aisló un nuevo organismo de características similares a *P. salmonis*. Este nuevo hallazgo se logró en Salmones del Atlántico de 20 a 100 g que se encontraban en el lago Llanquihue y que posteriormente fueron trasladados al mar (Cvitanich y col, 1995). El agente aislado fue denominado UA2, posteriormente se le denominó U2, esto como una forma de denominación más corta (Cvitanich y col, 1995). Adicionalmente en 1997 se aisló U2 (RLO) desde Puyes (*Galaxias maculatus*) capturados en el Lago Llanquihue, alcanzando mortalidades acumuladas de un 87 % en un periodo de 10 meses (Enríquez y col., 1998). Los aspectos lesionales en el Puye y las características del agente aislado son similares a las descritas en Salmones del Atlántico por Cvitanich y col. (1995).

Características del Agente U2.

Una de las características de las rickettsias es su capacidad de crecer solo en células vivas de huéspedes infectados y no en medios comunes de laboratorio. A la fecha, U2 ha logrado ser cultivado en 7 líneas celulares de peces (EPC, CHH-1, CHSE 214, RTG 2, FHM, BB y BF-2) a temperaturas de 15 a 27°C. U2 produce efecto citopático detectable a los dos días en línea celulares EPC y un marcado efecto citopático a los 4 - 5 días, sin embargo no se ha observado crecimiento en medios bacteriológicos comunes, incubados entre 15 y 21°C (Cvitanich y col, 1995).

Al análisis microscópico, U2 se observa como un organismo inmóvil, Gram negativo, de forma esférica o cocoide, frecuentemente pleomórfico y de tamaño variable entre 0,2 - 0,8 um de diámetro, con localización tanto intra como extracelular (Cvitanich y col, 1995).

Taxonómicamente, U2 al parecer pertenecería al orden Rickettsiales y a la familia Rickettsiaceae, sin embargo se requieren mayores investigaciones para su identificación y clasificación definitiva.

Desarrollo de la Enfermedad U2.

Las mortalidades en Salmón del Atlántico causadas por U2 se presentan a temperaturas que fluctúan entre 9 y 17°C, siendo estas del orden del 4 al 12 % semanal en fase de agua dulce, situación que persiste con posterioridad en la fase marina hasta la sexta semana (Cvitanich y col., 1995).

En relación a la patología de este cuadro, la infección al parecer tendría su origen a nivel renal y esplénico, originándose septicemia e infección sistémica con desarrollo de lesiones en diferentes tejidos y órganos. U2 no ha sido detectado en frotis de sangre, a diferencia de *P. salmonis* (Cvitanich y col., 1995).

Aspectos Lesionales Originados por U2.

Los peces afectados severamente por U2 presentan coloración normal o levemente oscura, siendo a menudo pequeños y cursando con severa emaciación. Por otra parte, las branquias se aprecian pálidas y evidencian severa anemia (Hematocrito menor a 20 %) (Cvitanich y col., 1995).

A la necropsia, los riñones se observan levemente tumefactos y de coloración gris oscura, de igual forma el bazo se aprecia tumefacto, pudiendo presentar áreas blanquecinas (Cvitanich y col., 1995).

Es así como a través de la presente investigación tiene por objetivo, poder determinar experimentalmente la susceptibilidad de Salmón del Atlántico (*S. salar*), Salmón Coho (*O. kisutch*) y Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) a la inoculación intraperitoneal de U2 (RLO) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*), como también caracterizar los aspectos lesionales macro y microscópicos provocados por U2.

El establecer el patrón lesional, permitirá diagnosticar el cuadro en cuestión y a su vez establecer las similitudes y diferencias en relación con la Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) y otras patologías. De igual forma, se podrán tomar medidas profilácticas, que permitan un adecuado control de la enfermedad y contribuir con la epidemiología de esta condición.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 MATERIAL

El material de la investigación estuvo constituido por 47 Salmones del Atlántico (*S. salar*), 47 Salmones Coho (*O. kisutch*) y 44 Truchas Arco iris (*O. mykiss*), con un peso promedio de 28.5 +/- 10.5; 51.6 +/- 40.7, 96.8 +/- 16.6 g respectivamente. Fueron inoculados vía intraperitoneal con U2 (RLO) aislado de Puye (*G. maculatus*), colectados desde el lago Llanquihue, que se mantuvieron en cultivo durante 30 días a una temperatura promedio de 20 °C. Además se mantuvo un grupo Control con 15 peces (5 Salmones Coho, 5 Salmones del Atlántico y 5 Trucha Arcoiris) con un peso promedio de 64.87 +/- 46.94 g, mantenidos en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

Los peces se distribuyeron en 4 estanques con agua salada (20 % de salinidad) recirculante en un volumen de 150 litros cada uno, con aireación constante y a una temperatura promedio de 12 +/- 0,4 °C. La alimentación de los peces consistió en una dieta seca comercial en cantidad equivalente al 2% de su peso corporal.

El agua salada se obtenía de la playa los Molinos, se iba a buscar con bidones 1 o 2 veces por semana dependiendo del grado de turbidez de los estanques.

4.1.1 Materiales sala de acuarios

- a.- 4 estanques de fibra de vidrio con una capacidad total de 200 litros.
- b.- 4 filtros de carbón activado.
- c.- 4 difusores - aireadores.
- d.- 1 tubo de oxígeno con una capacidad de 2.000 libras que se utilizaba en caso de emergencia (corte de luz).

4.1.2 Materiales de laboratorio

Material de disección:

- a.- 2 tijeras mayo.
- b.- 1 bisturí con su mango respectivo.
- c.- 2 pinzas anatómicas,
- d.- Bandeja para realizar la disección,
- e.- Toalla nova,
- f.- Portaobjetos,
- g.- Tubo de hematocrito.
- h.- Tinciones: GRAM, GIEMSA, IFAT - U2.

4.2 METODO

La totalidad de los peces fueron inoculados simultáneamente el día 7 de Agosto de 1998, con 0,1 ml de U2 aislado de Puye en dosis de 10^2 TCDI50 por pez, vía intraperitoneal, el grupo control también fue inoculado el mismo día con 0.1 ml de medio de cultivo de células (MEM) vía intraperitoneal. Se determinó la presencia de dicho agente mediante la aplicación de los Postulados de Koch.

4.2.1 Método de Inoculación

De cada estanque se sacaron la totalidad de los peces y se trasladaron a otro estanque con aireación propia, desde aquí se tomaron 5 peces traspasándolos a un balde con 30 litros de agua previamente adicionado el anestésico BZ - 20[®] (1 : 50). Al momento que los peces estaban sedados se retiraban del agua y se aplicaba la inyección intraperitoneal (i.p.) retornándolos a su acuario original.

Los acuarios fueron revisados diariamente y se llevó un control de mortalidad por día y acumulada. Los peces clínicamente enfermos fueron sometidos a los siguientes estudios para comprobar que padecían la enfermedad:

- Examen clínico externo e interno.
- Frotis sanguíneo para ser procesado mediante la tinción de GIEMSA (ANEXO 6).
- Hematocrito.
- Reaislamiento y titulación del agente, realizado en la unidad de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.
- Frotis y/o improntas de hígado, bazo y riñon para tinción de GRAM (ANEXO 5).
- Cortes histológicos de hígado, bazo y riñon de 2 peces, que fueron procesados y teñidos con la técnica tintorial Hematoxilina - Eosina (H/E) (Luna, 1969). Las muestras fueron procesadas e interpretadas en la unidad de Anatomía Patológica Veterinaria de la Universidad Austral de Chile.
- Se realizó frotis del tejido renal y esplénico de 2 peces, para ser procesado mediante la técnica de IFAT - U2 (ANEXO 7). Las muestras fueron derivadas al Laboratorio Aquatic Health ubicado en la ciudad de Puerto Montt.
- Frotis de tejido renal y esplénico de 2 peces, para Microscopía Electrónica. Las muestras se procesaron e interpretaron en el Instituto de Fisiología de la Universidad Austral de Chile.

Solo se pudo realizar este esquema de trabajo en Salmón del Atlántico ya que fue la única especie en la cual se presentaron signos clínicos, en cambio en el grupo experimental de Salmón Coho y Trucha Arcoiris se procedió a sacrificar 8 a 10 peces diarios de cada grupo 30 días post - inoculación, para poder identificar la presencia del agente Rickettsial (U2), el grupo control se sacrifico al final del ensayo.

® VETERQUIMICA

Camino Melipilla5641, los Cerrillos, Santiago.

4.2.2 Reaislamiento y Titulación

Se extrajo bazo y riñón en pool de 2 peces (Salmones del Atlántico) que se depositaron en 5 ml de MEM al 2 % del suero fetal sin antibiótico, luego se procedió a macerar los órganos hasta obtener una mezcla homogénea en diluciones 1 : 10.

El título se obtuvo realizando diluciones seriadas del homogeizado según el método de Reed y Muench (1938); para ello se colocaron 0.1 ml del homogenado de órganos en 0.9 ml de MEM al 2 % de suero fetal sin antibiótico, hasta llegar a una dilución 10^{-9} , luego se agregó 0.1 ml de cada una de estas diluciones a un pocilio de una microplaca de titulación que contiene una monocapa de células CHSE - 214, de 12 - 24 hrs de incubación; cada dilución se sembró en sextuplicado. La lectura se realizó diariamente durante 14 días verificando la presencia de CPE (efecto citopático) y se calculó el título bacteriano en TCID₅₀/ml. Las muestras fueron procesadas en el Instituto de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.2.3 Análisis estadístico

El análisis de los resultados del ensayo corresponde a un análisis de tipo descriptivo.

5. RESULTADOS

5.1 Salmón del Atlántico (*Salmo salar*):

5.1.1 Mortalidad

Todos los peces inoculados murieron, comprobando mediante los postulados de Koch que el organismo aislado es el causante de la enfermedad. En la tabla N° 1 se presentan las tasas de mortalidad diaria y acumulada de Salmón del Atlántico provocado por U2 inoculado intraperitonealmente.

Tabla 1. Tasa de mortalidad diaria y acumulada de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), inoculados intraperitonealmente con RLO (U2) en dosis de 10^2 TCID₁₀ / pez a 12 +/- 0.4 °C.

FECHA	DIA POST INOC.	MORTALIDAD		MORTALIDAD ACUMULADA	
		N°	%	N°	%
7 -ago	0	0	0	0	0
10 -ago	3	1	2,13	1	2,13
11 -ago	4	1	2,13	2	4,26
16 -ago	9	1	2,13	3	6,38
20 -ago	13	1	2,13	4	8,51
26 -ago	19	2	4,26	6	10,64
31 -ago	24	2	4,26	8	14,89
1 -sep	25	1	2,13	9	19,15
3 -sep	27	1	2,13	10	21,28
5 -sep	29	1	2,13	11	23,4
7 -sep	31	6	12,77	17	36,17
8 -sep	32	2	4,26	19	40,43
9 -sep	33	1	2,13	20	42,55
10 -sep	34	6	12,77	26	55,32
11 -sep	35	4	8,51	30	63,83
12 -sep	36	5	10,64	35	74,47
15 -sep	39	10	21,28	45	95,75
16 -sep	40	2	4,26	47	100

En esta tabla se presentan los días que se encontraron peces muertos / moribundos. De un total de 47 peces murió el 100 % entre los días 3 y 40 p.i. El mayor porcentaje de mortalidad se concentró entre los días 31 y 40 p.i, que correspondió a un 76.6 %. En el gráfico N° 1 se pueden apreciar las tasas de mortalidad diaria y acumulada del Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

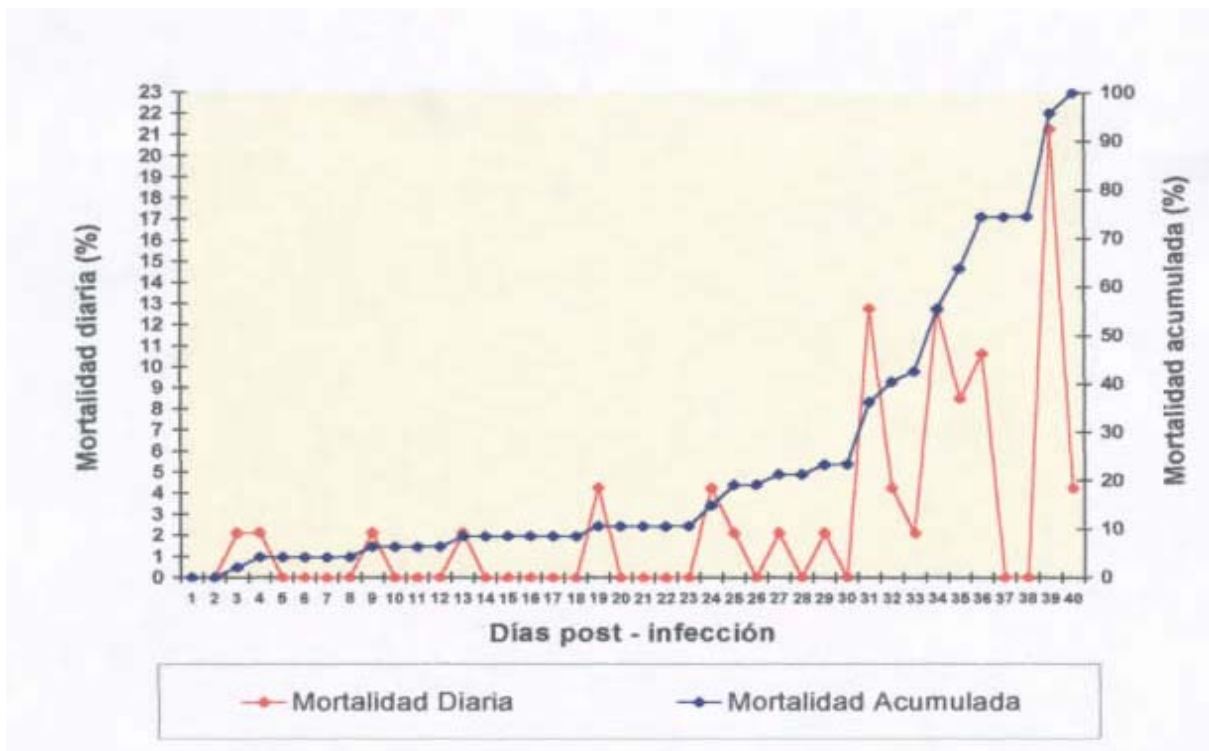


Gráfico 1: Tasa de mortalidad diaria y acumulada de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados con U2 en dosis de 10^2 TCID₁₀/pez a 12 ± 0.4 ° C.

5.1.2 Patología Macroscópica

5.1.2.1 Signos clínicos externos e internos

Los peces moribundos se observaron letárgicos, a nivel de la superficie del agua, presentando externamente pérdida de escamas de fácil desprendimiento al tacto, palidez branquial, exoftalmia, aletas roídas y un estado de nutrición malo. Internamente se observó hígado pálido, hemorrágico, con diferentes grados de congestión y en algunos casos con presencia de nodulos blanquecinos, la vesícula biliar pletórica en la totalidad de los casos; esplenomegalia y en algunos casos se evidencia la presencia de nodulaciones de color blanco; riñón aumentado de tamaño; estómago dilatado con paredes muy delgadas y un contenido mucoso amarillento; la cavidad abdominal presentó una ascitis serosanguinolenta y áreas hemorrágicas en grasa visceral, ciegos pilóneos y estómago. La figura N° 1 muestra un alevín de Salmón del Atlántico inoculado con U2 en dosis de 10^2 TCID₁₀ / pez a 12 ± 0.4 ° C con lesiones evidentes.



FIGURA N° 1: Alevin de *Salmo salar* inoculados en dosis de 10^2 TCID₁₀ / pez a 12 ± 0.4 °C, positivo a U2, muerto a los 34 días post-inoculación, se puede apreciar una ascitis serosanguinolenta y hemorragias difusas en ciegos pilóricos y grasa abdominal.

El hematocrito promedio en este grupo fue de un 19.88 ± 8.54 %, y el hematocrito del grupo control correspondió a un 45.47 ± 3.48 %.

5.1.3 Patología Microscópica

5.1.3.1 Histología

De 2 peces muertos los días 34 y 36 post - inoculación se extrajo hígado, bazo y riñón de cada uno de ellos, obteniendo los siguientes resultados:

5.1.3.1.1 Hígado:

El parénquima presenta necrosis multifocal de hepatocitos con una reacción inflamatoria mononuclear y grandes vacuolas intracelulares que incluyen pequeños microorganismos esféricos basófilos. Además se observó una moderada tumefacción turbia difusa de los hepatocitos. En la figura N° 2 se aprecian cortes histológicos de hígado, bazo y riñón que fueron procesados y teñidos con la técnica tintorial Hematoxilina - Eosina (H/E). El diagnóstico histopatológico corresponde a una hepatitis necrotizante multifocal.

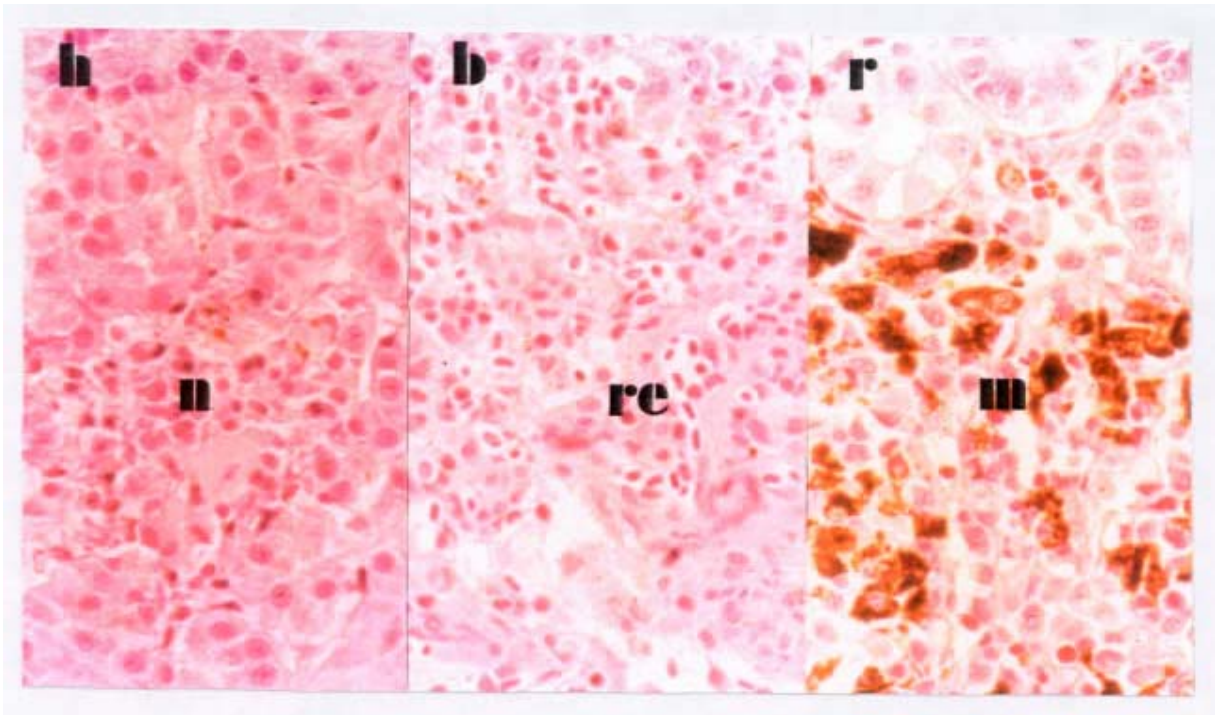


FIGURA N° 2. Cortes histológicos de hígado (h) con áreas focales de necrosis (n); bazo (b), con predominio de células reticulares (re) y riñón (r) con incremento de células melanomacrofágicas (m) en forma difusa, epitelios tubulares con trastornos degenerativos que fueron procesados y teñidos con la técnica tintorial Hematoxilina - Eosina (H/E) de Salmón del Atlántico inoculados en dosis de 10^2 TCID₁₀/pez a 12 +/- 0.4 ° C. 400X

5.1.3.1.2 Riñón:

Incremento moderado de las células melanomacrofágicas en forma difusa. Los glomérulos presentaron abundante material proteico en el espacio de Bowman. Los epitelios tubulares presentan distintos grados de trastornos degenerativos (Vacuolización citoplasmática), hasta signos de necrosis. En el intersticio se observó algunas células con grandes vacuolas que contienen múltiples microorganismos esféricos basófilos. Diagnóstico: nefritis intersticial y tubulonefrosis moderada.

5.1.3.1.3 Bazo:

Incremento moderado de células melanomacrofágicas, encontrándose en ellas abundantes microorganismos esféricos basófilos. El parénquima presenta predominio de células reticulares. Diagnóstico: esplenitis difusa.

5.1.4 Detección del agente en distintos órganos

5.1.4.1 Tinción de Gram

Microscópicamente las improntas de hígado (h), bazo (b) y riñón (r) presentaron formas cocoides gram negativas, muy pequeñas, pleomórficas de 0.2 - 0.8 μm de diámetro, en cúmulos intracelulares y extracelulares. Estos cúmulos estaban en mayor cantidad en bazo y riñón, no así en hígado (FIGURA N° 3).

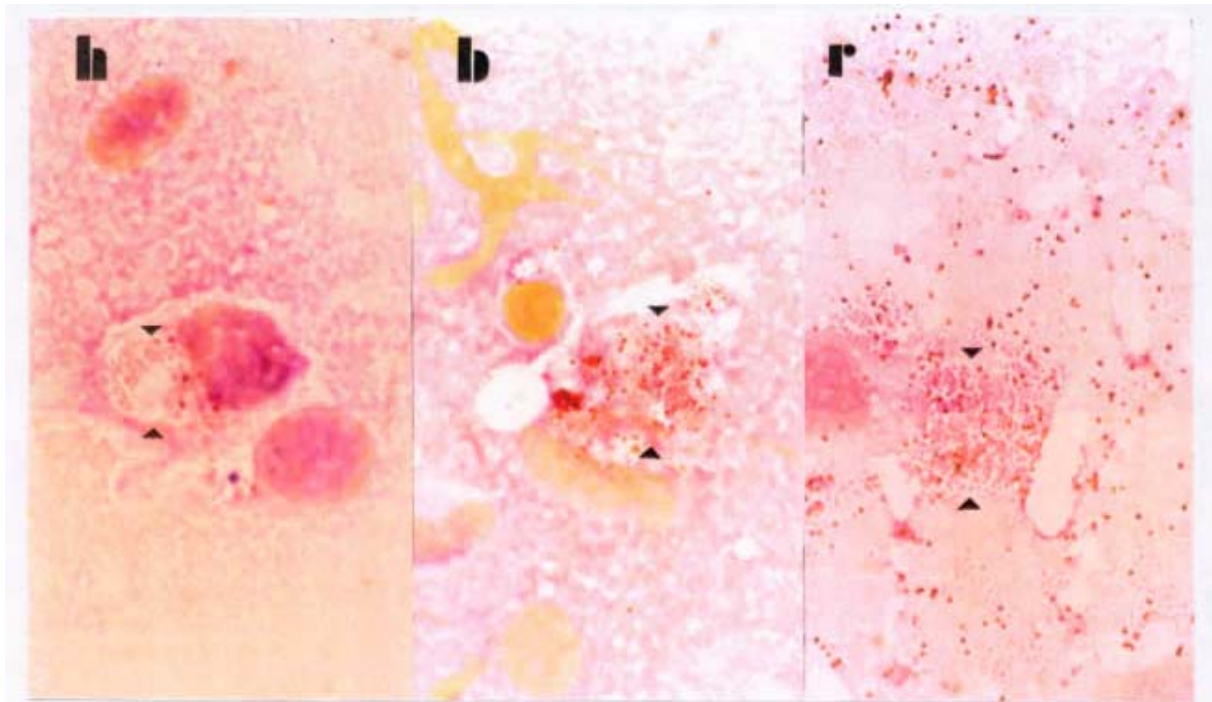


FIGURA N° 3. Imprintig de hígado (h), bazo (b) y riñón (r) teñidos con tinción de Gram, en los cuales se puede apreciar microorganismos cocoides gram negativos, muy pequeñas 0.2 - 0.8 μm de diámetro de ubicación tanto intracelular como extracelular. 1.000X.

5.1.4.2 Tinción de Giemsa

*,

La tinción Giemsa de los frotis de sangre reveló la presencia de cúmulos cocoides en el citoplasma de macrófagos, como también una gran cantidad de eritrocitos inmaduros y de melanomacrófagos, segmentados y linfocitos (FIGURA N° 4).

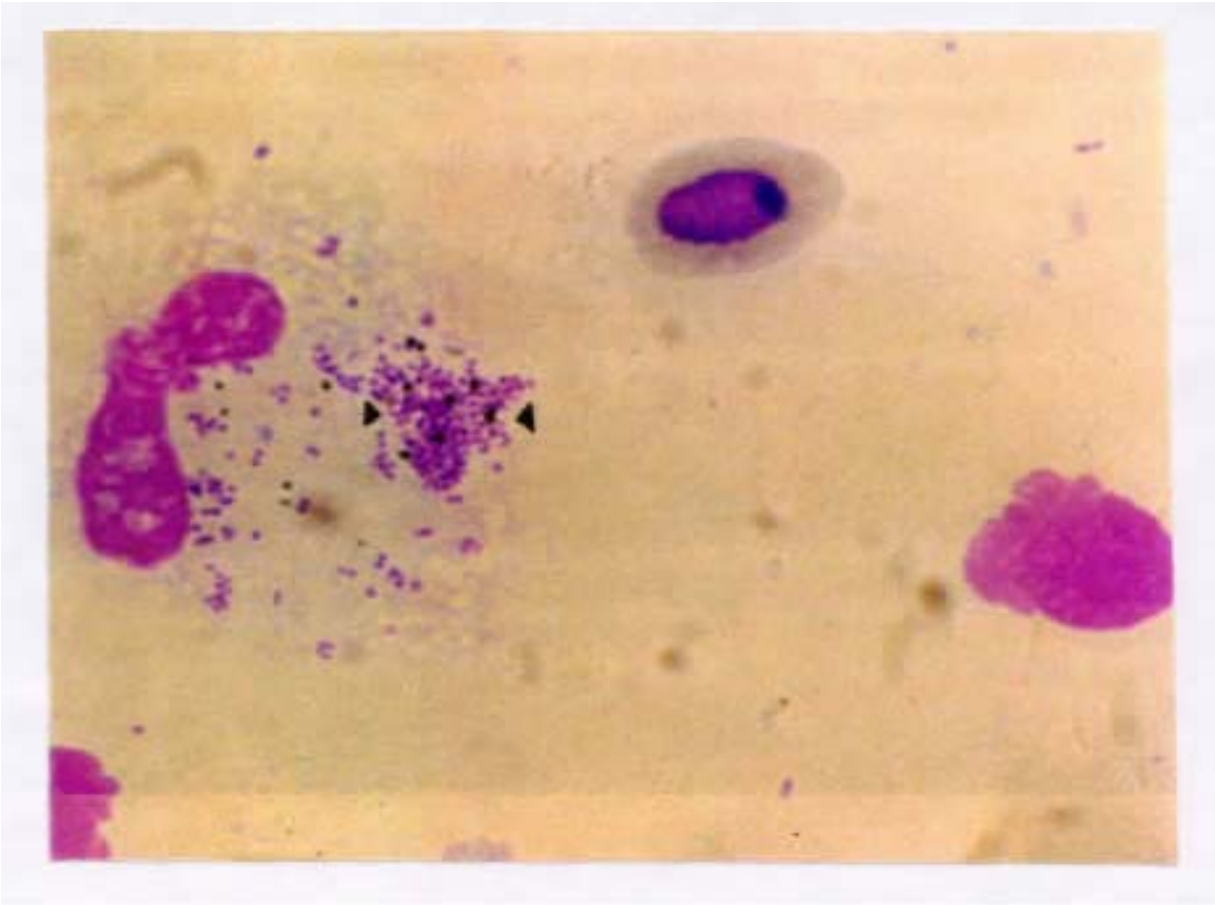


FIGURA N° 4. Frotis de sangre con tinción de Giemsa en la cual se puede apreciar microorganismos cocoides de tamaño muy pequeño (0.2 - 0.8 μm de diámetro). 1.000 X.

5.1.5 Reaislamiento y Titulación

De los peces encontrados muertos / moribundos los días 34 y 36 post - inoculación, se pudo aislar el agente rickettsial, confirmando los postulados de Koch.

El título obtenido por gramo de tejido (Bazo y Riñon) correspondió a 10^6 TCIDio / g.

5.1.6 Confirmación

5.1.6.1 IFAT-U2

La figura N° 5 muestra un frotis de tejido renal y esplénico de Salmón del Atlántico con fluorescencia a U2. Se visualizó una fluorescencia (IFAT - U2) específica de las formas cocoides intra y extracelulares en niveles de 1.500 a 10.000 U2 / 100 CMD (Campos Microscópicos).

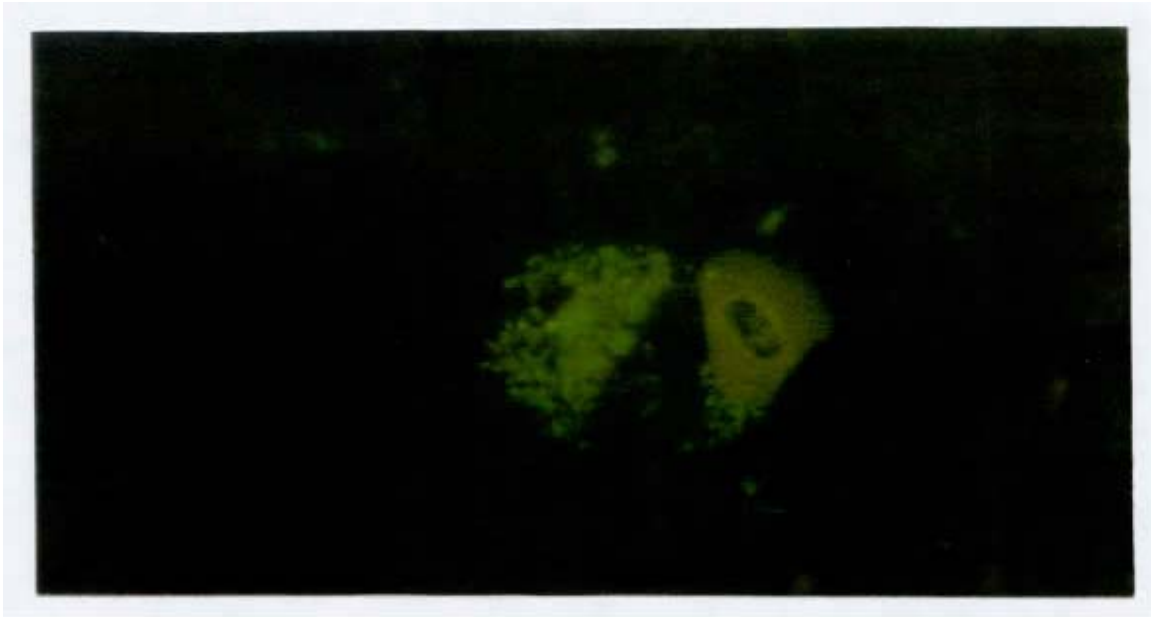


FIGURA N° 5: Inmunofluorescencia indirecta para U2 (IFAT - U2), se observan agentes rickettsiales fluorescentes en un frotis de tejido renal y esplénico de Salmón del Atlántico inoculados en dosis de 10^2 TCID₁₀ / pez a 12 ± 0.4 ° C. 1820x.

5.1.6.2 Microscopía Electrónica

La Microscopía Electrónica de bazo, de los peces afectados con U2 reveló la presencia de abundantes formaciones cocoides y ovals intracitoplasmáticas, con una membrana simple y material electrodens en la periferia (Figura N° 6).

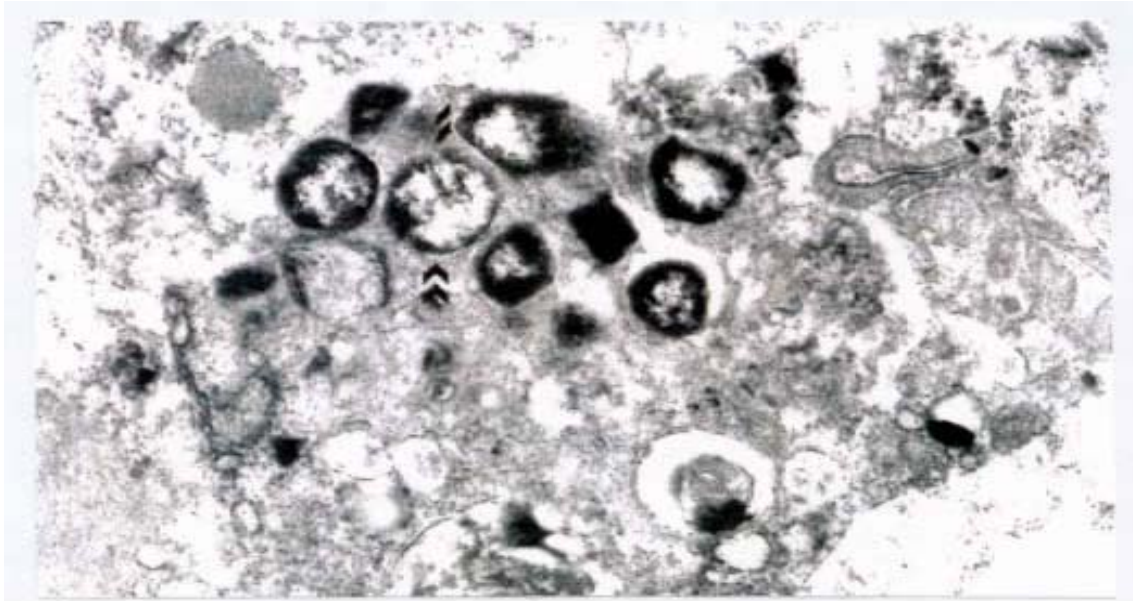


FIGURA N°6: Microfotografía de bazo de Salmón del Atlántico inoculado i.p. con U2 (RLO) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) 7.500x

5.2 Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*):

En los peces inoculados no se produjo mortalidad durante todo el todo período experimental que duro 40 días post - inoculación. Al día del término del experimento los peces fueron eutanasiados y ninguno de los peces inoculados demostró signos clínicos o lesiones macroscópicas a la necropsia. En los anexos N° 2 y 3 se presentaron los pesos promedios, hematocrito y cada uno de las pruebas diagnósticas que se realizaron para comprobar la presencia de U2 (RLO).

5.3. Grupo control:

No se produjeron mortalidades durante todo el período que duro el ensayo. A la necropsia d ellos peces sobrevivientes no se evidenciaron signos clínicos o lesiones macroscópicas. En el anexo N° 4 se presentaron los pesos promedios, hematocrito y cada una de las pruebas diagnósticas que se realizaron para comprobar que no existía la presencia de U2 (RLO).

6. DISCUSION

Este estudio se realizó para evaluar la susceptibilidad de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoiris (*Oncorhynchm mykiss*), (especies salmonídeas de importancia en la salmonicultura nacional), a la inoculación intraperitoneal de U2, un microorganismo semejante a rickettsia (RLO), aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) colectado del lago Llanquihue.

Después de infectar los alevines de Salmón del Atlántico, Salmón Coho y Trucha Arcoiris con U2 (RLO) aislado de Puye se pudo determinar que la especie susceptible fue el Salmón del Atlántico, presentando signos clínicos evidentes y mortalidad asociada.

Clínicamente los Salmones del Atlántico infectados con U2 i.p. se observaron letárgicos a nivel de la superficie del agua, presentando una coloración normal o levemente oscuros y las branquias pálidas. Cvitanich y col. (1995) indica que los peces severamente afectados por U2 presentan una coloración normal o levemente oscura, siendo a menudo pequeños y cursando con una severa emaciación. Esto se puede apreciar en el Anexo N°1, que después de 40 días post - inoculación, este grupo prácticamente no aumentó su biomasa, terminando con un peso promedio de 28.15 +/- 10.54 g. Internamente, estos peces evidenciaron palidez de los órganos, hepatomegalia y esplenomegalia, con múltiples pequeños nodulos blanco grisáceos en el bazo e hígado. Ocasionalmente el estómago e intestino se encontraron sin alimento con un contenido mucoso amarillento y de paredes muy delgadas, casi transparentes y de aspecto hemorrágico, características que concuerdan con las descritas por Enríquez y col. (1998) para Puyes enfermos de U2 y Cvitanich y col. (1995) lo describe para Salmones del Atlántico. Además estas lesiones son similares a las producidas por *P. salmonis* en Salmones del Atlántico afectados de Piscirickettsiosis (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich y col., 1991; Branson y Nieto, 1991).

En la primera etapa de la Piscirickettsiosis, el agente ha sido localizado solamente en el cerebro (Bravo, 1994 a), observándose como signo más característico la alteración de la natación, los peces se ubican en las esquinas de las balsas jaulas en sentido contrario de la corriente, se aprecian letárgicos, suben a la superficie y no reaccionan a estímulos externos, además presentan anorexia y respiración dificultosa (Bravo y Campos, 1989; Alvarado y col., 1990 b; Gárate, 1990; Schäfer y col., 1990, Garcés y col., 1991). Internamente el tracto digestivo se observa sin alimento, los órganos sin alteración y no se detecta en ellos la presencia del patógeno (Bravo, 1994 a). En estados más avanzados, la piel se observa oscurecida a nivel del dorso y flancos, abdomen abultado, a nivel cutáneo se aprecia pequeñas induraciones epidérmicas, fragilidad de escamas, hemorragias petequiales y equimóticas a nivel de la base de las aletas, vientre, zona perianal y en algunos casos periorculares, además presentan palidez branquial (Bravo y Campos, 1989; Alvarado y col., 1990 b; Cvitanich y col., 1990; Schäfer y col., 1990; Branson y col., 1991).

En relación a la patología causada por U2, la infección al parecer tendría su origen a nivel renal y esplénico, originándose septicemia e infección sistémica con desarrollo de lesiones en diferentes tejidos y órganos (Cvitanich y col., 1995).

Las mortalidades observadas en este ensayo, causadas por U2, fueron del orden del 4 a 8 % semanal en las primeras cuatro semanas, situación que se duplica y triplica en la quinta y sexta semana respectivamente (Tabla N°1). Se presentaron a temperaturas que fluctuaron entre 9 y 14 °C. Cvitanich y col. (1995) determinó que las mortalidades causadas por U2 en Salmones del Atlántico cultivados en el Lago Llanquihue se presentan a temperaturas que fluctúan entre 9 y 17 °C, siendo estas del orden del 4 al 12 % semanal en fase de agua dulce, situación que persiste con posterioridad en la fase marina hasta la sexta semana, por lo que resultan similares a las determinadas en este estudio.

La palidez branquial es producto de una severa anemia, corroborado por valores de hematocrito que fluctuaron entre un 12 % y un 40 % en peces clínicamente enfermos (ANEXO 1) y entre un 38 % y un 52 % en peces aparentemente sanos (ANEXO 4).

Al realizar los hematocritos se obtuvo un promedio de un 19.88 %. Se debe tomar en cuenta que el 72.3 % de las muestras analizadas se encontraban bajo un 20% de hematocrito (ANEXO N° 1).

Al análisis microscópico U2 se observó como un organismo inmóvil, gram negativo de forma esférica o cocoide, frecuentemente pleomórfico de 0.2 a 0.8 um de diámetro en cúmulos intracelulares y extracelulares, situación que concuerda con lo descrito por Cvitanich y col.(1995). La gran cantidad de microorganismos que se pudieron encontrar en bazo y riñón (Anexo N° 1), estaría indicando la posibilidad de ser órganos "target", para luego originar septicemia e infección sistémica con desarrollo de lesiones en diferentes órganos y tejidos.

Según Cvitanich y col. (1995) U2 no ha podido ser detectado en frotis de sangre, a diferencia de *P. salmonis*. Sin embargo en este estudio, en los peces clínicamente enfermos la tinción de Giemsa reveló la presencia de cúmulos cocoides en el citoplasma de macrófagos en los cuales no se observaron vacuolas, como también una gran cantidad de eritrocitos inmaduros y de melanomacrófagos, segmentados y linfocitos.

Mediante la tinción de Giemsa y Microscopía Electrónica (M.E.), en el citoplasma de células renales y esplénicas infectadas del Salmón del Atlántico, se detectaron cúmulos de microorganismos de tamaño muy pequeño. Los estudios efectuados mediante M.E. mostraban que los cúmulos en el interior de las células no presentaban vacuolas, en contraposición a *P. salmonis* (Cvitanich y col., 1995). Esta sería una de las diferencias morfológicas que existiría entre U2 y *P. salmonis*, además del tamaño de U2 que es 3 - 4 veces más pequeño que *P. salmonis*¹.

¹ Comunicación personal. Dr. Ricardo Eniquez.
Ictiopatología. Universidad Austral de Chile.

Histológicamente, el parénquima hepático presentó necrosis multifocal de hepatocitos con una reacción inflamatoria mononuclear y grandes vacuolas intracelulares que incluyen pequeños microorganismos esféricos basófilos. Además se observó una moderada tumefacción turbia difusa de los hepatocitos. En el riñón se observó un incremento moderado de las células melanomacrofágicas en forma difusa. Los epitelios tubulares presentan distintos grados de trastornos degenerativos, hasta signos de necrosis, situación similar a las descritas por Enríquez y col.(1998) para Puye. Además en el intersticio de las células renales se observó algunas células con grandes vacuolas que contienen múltiples microorganismos esféricos y basófilos. Cvitanich y col. (1995) determinó histológicamente que los cambios más significativos provocados por U2, se produjeron en hígado, bazo y riñón, encontrando en ellos gran cantidad de células melanomacrofágicas. En hígado pudo observar una necrosis difusa suave, hepatitis generalizada con una vasculitis severa; bazo, esplenitis difusa; nefritis intersticial y una tubulonefrosis. Además pudo determinar que los órganos más infectados fueron el riñón y bazo, con un título mayor a 10^9 U2 / g de tejido, en contraposición a SRS que puede alcanzar un título entre 10^7 y 10^8 UA / g de tejido, en cambio en este estudio se alcanzó un título de 10^6 U2 / g de tejido, indicando que el agente rickettsial se multiplica dentro del organismo y se disemina por vía sistémica.

Las afecciones histológicas provocadas por SRS se relacionan con afecciones degenerativas, trastornos inflamatorios y necróticos, principalmente a nivel de riñón, hígado, bazo y tejido hematopoyético (Garcés y col., 1991), además presentan una reacción de tipo fibroblástica difusa observada principalmente en hígado riñón y bazo (Alvarado y col., 1990b; Cubillos y col., 1990; Branson y col., 1991).

Otro tipo de lesiones originados por U2 descrito por Cvitanich y col. (1995) lo constituye el engrosamiento de la cápsula esplénica (edema) y la depleción linfoide, la cual suele estar acompañada de inflamación granulomatosa. Una de las características constantes en esta condición lo constituyen pequeñas áreas focales de células melanomacrofágicas infectadas. En relación a este punto descrito por Cvitanich y col. (1995) se diferencia que en este ensayo, el bazo presentó un incremento moderado de células melanomacrofágicas, encontrándose en ellas abundantes microorganismos esféricos y basófilos, con bastante predominio de células reticulares en el parénquima.

El diagnóstico histopatológico de Salmón del Atlántico infectados con U2 i.p. en este estudio es: hepatitis necrotizante multifocal; nefritis intersticial multifocal y tubulonefrosis moderada; esplenitis difusa. Todos estos cambios inflamatorios que presentaron los órganos, son atribuibles a la presencia de U2 en los peces infectados.

Esta afección tiene distribución sistémica, sin embargo, el grado de infección y daño es variable, es así como el corazón, músculos, tracto digestivo, branquias, ojo y cerebro presentan bajas concentraciones de U2 (Cvitanich y col., 1995).

La ausencia de positividad en este estudio en Salmón Coho y Trucha Arcoiris inoculados i.p. con U2 podría estar sugiriendo que son especies no susceptibles. Al respecto *P. salmonis* no fue inicialmente patógeno para Salmón del Atlántico y Trucha Arcoiris, en contraposición a Salmón Coho que fue la especie en la cual se inició la Piscirickettsiosis, situación que podría repetirse en el caso de U2, que en un principio solo afecte a Salmón del Atlántico para luego afectar a Salmón Coho y Trucha Arcoiris, produciendo el mismo tipo de lesiones macro y microscópicas. Otra posibilidad de que Salmón Coho y Trucha Arcoiris no presentaran ningún signo clínico, podría ser que la dosis de inoculación fue demasiado baja para que se desarrollara en estas dos especies. También existe la posibilidad que el periodo de incubación para Salmón Coho y Trucha Arcoiris sea mayor a los 40 días.

Desde el punto de vista epidemiológico U2 ha sido aislado de Salmón del Atlántico tanto en fase de agua dulce como marina, de igual forma en estuarios. Al parecer este cuadro se iniciaría en agua dulce para continuar con los peces en su fase de agua de mar (Cvitanich y col., 1995).

Enríquez y col. (1998) reportó el primer hallazgo de U2 en una especie silvestre de agua dulce (*Galaxias maculatus*), que se asocia a salmonídeos de cultivo. Situación que haría sospechar un posible contagio desde salmonídeos de cultivo a esta especie silvestre, mediante una posible transmisión horizontal. Estudios in vitro realizados por Lannan y Fryer (1994) han demostrado una sobrevivencia relativamente prolongada de *P. salmonis* en agua salada, lo cual sugiere que el agente rickettsial presente en el contenido fecal, en condiciones marinas, sería capaz de transmitirse horizontalmente. Esta vía de excreción podría explicar los resultados obtenidos por Cvitanich y col. (1991), que indican una transmisión horizontal para la enfermedad en ausencia de vectores.

La ubicación intracelular en las células del sistema fagocítico mononuclear en el caso de *P. salmonis* (Bravo y Campos, 1989; Cubillos y col., 1990; Cvitanich y col., 1990; Gárate, 1990) y U2 (Cvitanich y col., 1995) dificultan su control, ya que esta ubicación, protege al agente de las sustancias terapéuticas (Austin, 1985; Fryer y Lannan, 1993; Bravo, 1994a) y de los mecanismos de defensa extracelular del huésped, como son el complemento y los anticuerpos.

Aun cuando *P. salmonis* es sensible in vitro, a muchos antibióticos comunmente usados, como tetraciclina, eritromicina, ácido oxolínico, estreptomycin, gentamicina, exceptuando a penicilina (Cvitanich y col., 1990; Fryer y col., 1990; Bravo y Gutiérrez, 1991; Lannan y Fryer, 1993). Estos no han sido eficaces en terreno (Gárate, 1990; Bravo y Gutiérrez, 1991; Lannan y Fryer, 1993). Lo interesante es que la información de terreno que tenemos indica que U2 responde más rápidamente y eficientemente a una terapia antibiótica que *P. salmonis*². Debido a esto, el uso de vacunas para el control de ésta enfermedad es considerado de suma importancia (Lannan y Fryer, 1993).

² Comunicación Personal. Dr. Ricardo Enríquez.
Ictiopatología. Universidad Austral de Chile

Por tratarse de agentes rickettsiales (SRS, U2) para los cuales aun no existe un tratamiento efectivo, la prevención y profilaxis deberán ser las principales herramientas para evitar que la enfermedad se desarrolle, tratando que el pez logre un equilibrio con el agente patógeno. Frente a estos cuadros los piscicultores deberán planificar sus estrategias de producción, minimizar al máximo toda actividad que signifique estrés para los peces, sobre todo cuando sabemos que es potenciado por cualquier agente o factor perturbador

Taxonómicamente U2 pertenecería al orden Rickettsiales y a la familia Rickettsiaceae (Cvitanich y col., 1995) sin embargo se requieren mayores antecedentes para su identificación y clasificación definitiva. En este sentido se contribuye a establecer que U2 es intracelular, tiene características tintoriales similares a *P. salmonis*, además clínicamente e histológicamente presenta el mismo tipo de lesiones. En cambio Fryer y col. sugirieron en 1992 que el organismo causal de SRS pertenecería al orden Rickettsiales, familia Rickettsiaceae, tribu Ehrlicheae, por sus características; sin embargo concluyeron que no pertenecía a ningún género ni especie establecida, debido a diferencias respecto a la especificidad del huésped y a características serológicas. Por estas razones, este patógeno fue incluido en un nuevo género y especie de la familia Rickettsiaceae, denominándose *Piscirickettsia salmonis gen. nov., sp. nov.*, por afectar a peces y haber sido reportada primeramente en salmones.

7. CONCLUSIONES

Basado en los resultados y en consideración a los objetivos previamente establecidos se puede concluir que:

1.- La especie susceptible a la inoculación intraperitoneal de U2 aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) fue el Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

2.- Salmón Coho (*O. kisutch*) y Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) siendo inoculados a igual dosis que Salmón del Atlántico (*S. salar*), no manifestaron ningún signo clínico que pudiera hacer sospechar la presencia del agente rickettsial, como tampoco se detectó en el reaislamiento y confirmación por IFAT - U2 y Microscopía Electrónica.

3.- El agente rickettsial pudo ser aislado y titulado desde Salmones del Atlántico (*S. salar*) confirmando los Postulados de Koch. Además el agente rickettsial se multiplicó en el organismo alcanzando un título de 10^6 TCDI₅₀/gr de tejido.

4.- U2 se aprecia morfológicamente diferente a *Piscirickettsia salmonis*.

8. BIBLIOGRAFIA

ALVARADO, V., J.W. SCHAFER, R. ENRIQUEZ, M. MONRAS. 1990a Salmonicultura en Chile, estado actual, proyecciones y estado sanitario. *Medio Ambiente* 11: 9 -14.

ALVARADO, V., J. W. SCHAFER, R. ENRIQUEZ, M. MONRAS, V. CUBILLOS, C. FARIAS, A. ALBERDI. 1990b. Nueva enfermedad del Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) cultivado en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. *Patología Animal* 4: 10 - 13.

AUSTIN, B. 1985. Evaluation of antimicrobial compounds for the control of Bacterial Kidney Disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. FishDis.* 8: 209 - 220.

BRANSON, E., D. NIETO DIAZ MUÑOZ. 1991. Description of a new disease condition occurring in a farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) in South America. *J. FishDis.* 14: 147-156.

BRAVO, S., M. CAMPOS. 1989. Síndrome del Salmón Coho. *Chile Pesquero* 54: 47 - 48.

BRAVO, S. Y S. GUTIERREZ. 1991. Avances en el estudio del Síndrome del salmón coho. *Chile Pesquero* 61: 39 - 42.

BRAVO, S. 1994 a. Primer reporte de *Piscirickettsia* en agua dulce. *Chile Pesquero* 79: 39 - 40.

BRAVO, S. 1994 b. *Piscirickettsia* in freshwater. *Bull Eur. Ass. Fish Pathol.* 14 (4): 137 - 138.

BROKLEBANK, J., D SPEARE, R. AMSTRONG, T. EVELYN. 1992 Septicemia in farmed atlantic and chinook salmo due to a *Rickettsia*-like agent. *FSH/AFS Newsletter* 20: 1.

BROKLEBANK, J.; T EVELYN; D: SPEARE; R: AMSTRONG. 1993 Rickettsial septicemia in farmed atlantic and chinook salmo in Brithis Columbia: clinical presentation and experimental transmission. *Can. Vet. J.* 34: 745 - 747.

BUSTOS, P. 1993. Pérdidas por enfermedades Bacterianas de Salmónidos en Chile. *AquanoticiasInternacional* 15: 4 - 13.

BUSTOS, P., P. ENTRALA, J. MONTAÑA, J. CALBUYAHUE. 1994. Septicemia Rickettsial Salmonidea (SRS), estudio de transmisión vertical en salmón coho (*O. kisutch*). En: Seminario Patología y Nutrición En El Desarrollo De La Acuicultura, Puerto Montt, Chile, pp. 33 - 40.

CUBILLOS, V., C. FRIAS, V. ALVARADO, W. SCHÄFER, M. MONRAS. 1990 Características anatomopatológicas del síndrome del salmón coho (SSC), una enfermedad de los salmonídeos. *Patología Animal* 2: 14 - 17.

CVITANICH, J., O. GARATE, C. SMITH. 1990. Etiological Agent in a Chilean Coho Disease Isolated and Confirmed by Kochs Postulates. *FHS/AFSNewsletter* 18: 1-2.

CVITANICH, J., O. GARATE, C. SMITH. 1991. The isolation of a rickettsia - like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. FishDis.* 14; 121 -145.

CVITANICH, J., O. GARATE, C. SILVA, M. ANDRADE, C. FIGUEROA, C. SMITH. 1995. Isolation of a new Rickettsia-like Organism from Atlantic Salmon in Chile. *FHS/AFS Newsletter* 23 (3): 1-3.

ENRIQUEZ, R., M. MONRAS, A. CEBALLOS, C. IGOR. 1998. Primer aislamiento de un organismo rickettsial desde *Galaxias maculatus* (Puye). *Archivos de Medicina Veterinaria. Número extraordinario.* Valdivia, Chile 1998. Volumen XXX. 233 - 234.

FOX, A.C. 1984. The importance of the environment stress and disease relationship in acuaculture. E.N: International Aquaculture Congress, Tokio, Japón, pp. 11-13.

FRYER, J. L., C. N. LANNAN, L. H. GARCES, J. J. LARENAS, P. A. SMITH. 1990 Isolation of a rickettsiales-like organism from disease coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* 25: 107 - 114.

FRYER, J. L., C. N. LANNAN, S. J. GIOVANNONI, N. D. WOOD. 1992 Piscirickettsia salmonis gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of an Epizootic Disease in Salmonid Fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 120 - 126.

FRYER, J., C. LANNAN. 1994. Rickettsial and Chlamidial infections of freshwater and marine fishes, bivalves and crustaceans. *Zoological Studies* 32 (2): 95 - 107.

GAGGERO, A., H. CASTRO Y A. SANDINO. 1995. First isolation of Piscirickettsia salmonis from coho salmon, O. Kisutch (Walbaum), and rainbow trout, O. Mykiss (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. *J. Fish Dis.* 18: 277 - 279.

GARATE, O. 1990. Combatiendo enfermedad del salmón coho. *Aquanoticias Internacional* 4:48-51.

GARCES, L, J. LARENAS, P. SMITH, S. SANDINO, C. LANNAN, J. FRYER. 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon (O. kisutch). *Dis. Aquatic Organisms* 11: 93 - 97.

KENT, M. L. 1992. Diseases of seawater net - pen reared salmonid fishes in the Pacific North west. *Canadian specialpublication offsheries andaquatic sciences* 94: 18-19.

LANNAN, C., J. FRYER. 1993. Piscirickettsia salmonis, a major pathogens of salmonid fish in Chile. *Fisheries Research* 17: 115-121.

LANNAN, C., J. FRYER. 1994. Extracellular survival of piscirickettsia salmonis . *J. Fish Dis.* 17: 545-548.

LUNA, L. G. 1969. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Tercera Edicion. Mcgraw-Hill. New York.

MENDEZ, R. y C. MUNITA. 1989. La salmonicultura en Chile. Ed. Ricardo Cortés, Santiago, Chile.

MENDEZ, R., L. VIDAL. 1994. La Salmonicultura chilena durante 1993. *Aquanoticias Inernacional* 20: 24 - 39.

MENDEZ, R. 1995. La salmonicultura chilena durante 1995. *Aquanoticias Internacional* 24: 5-14.

MENDEZ, R. 1997. La acuicultura a tres lustros de su partida . *Aquanoticias Internacional* 35: 7- 17.

REED, L. H. Y MUENCH. 1938. A simple method for stimating fifty percents and points. *Am. J.Hyg.* 27:493-497.

RODGER, H., E. DRINAN. 1993. Observation of a rickettsia- like organism in atlantic salmon, *Salmo salar*, in Ireland. *J. Fish Dis.* 16: 361 - 369.

SCHAFER, J. W., ALVARADO, R. ENRIQUEZ, M. MONRAS. 1990 The "Coho Salmón Syndrome" (C.S.S.): a new disease in chilean salmon reared in sea water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10: 130.

UACH/UCV 1992. Agentes bacterianos como patógenos de salmonideos y rol de los peces silvestres. Informe final proyecto CORFO y Asociación de Salmón y Trucha de Chile. 128p.

ANEXOS

ANEXO N° 1

ESPECIE:	SALAR
NUMERO:	47
INOCULACION:	7-ago

FECHA	GRAM			GIEMSA	HEMATOCRITO	PESO (gr)
	HIGADO	BAZO	RIÑON			
10-8	+	+++	+	+	16	36
11-8	++	+++	+++	+	13	20
16-8	-	+	-	-	37	38
20-8	-	+	-	-	35	47
24-8	-	+	-	-	34	40
26-8	++	+++	++	+	12	27
26-8	++	+++	++	++	15	25
31-8	+++	+++	++	-	14	34
31-8	+++	+++	+	+	16	26
1-9	++	+++	++	+++	17	28
3-9	+++	+++	+++	+++	15	18
5-9	++	+++	+++	+++	13	35
7-9	-	+	-	-	30	28
7-9	-	-	+	-	40	30
7-9	++	+++	++	++	18	31
7-9	-	+++	+++	-	21	81
7-9	+++	+++	+++	++	13	31
8-9	++	+++	+++	+	14	26
8-9	++	+++	+++	+++	12	26
8-9	++	+++	++	++	17	28
9-9	+	+++	+++	++	12	31
10-9	++	+++	++	+	15	24
10-9	+	+++	++	+	16	20
10-9	+	+++	+++	+	32	34
10-9	++	+++	++	-	30	32
10-9	+	+	+	+	13	21
10-9	-	+	-	-	14	21
11-9	++	+++	++	-	17	45
11-9	+	+++	++	++	17	29
11-9	+	+++	++	+++	35	25
11-9	++	++	+	++	18	25
11-9	++	+++	+++	+++	16	20
11-9	++	+++	++	++	32	34
11-9	+++	+++	+++	++	30	32
11-9	+++	+++	+++	+++	13	21
11-9	+++	+++	+++	+++	14	21
15-9	+++	+++	+++	-	14	29
15-9	-	+++	-	+	17	23
15-9	-	+++	+++	+	19	18
15-9	-	+++	+++	++	32	28
15-9	+	+++	+++	+++	23	26
15-9	+++	+++	++	+	15	20
15-9	++	+++	+++	-	13	16
15-9	+++	+++	+++	++	14	17
15-9	++	+++	++	+	16	18
15-9	+	+++	++	++	15	18
16-9	+	+++	++	++	12	24
16-9	-	+	-	-	38	24

POSITIVO:	+
NEGATIVO	-

PROMEDIO	19,87	28,14
DESV-ESTAND	8,53	10,54

Poca cantidad	+
Moderada cantidad	++
Alta cantidad	+++

ANEXO N° 2

ESPECIE:	COHO
NUMERO:	47
INOCULACION:	7-ago

GRAM						
FECHA	HIGADO	BAZO	RIÑON	GIEMSA	HEMATOCRITO	PESO (gr)
16-ago	-	-	-	-	48	35
20-ago	-	-	-	-	22	57
26-ago	-	-	-	-	37	26
9-sep	-	-	-	-	42	45
9-sep	-	-	-	-	48	45
9-sep	-	-	-	-	50	43
9-sep	-	-	-	-	46	28
9-sep	-	-	-	-	48	36
9-sep	-	-	-	-	42	114
9-sep	-	-	-	-	50	32
9-sep	-	-	-	-	45	25
9-sep	-	-	-	-	47	36
9-sep	-	-	-	-	44	25
9-sep	-	-	-	-	33	20
9-sep	-	-	-	-	38	20
9-sep	-	-	-	-	43	18
9-sep	-	-	-	-	45	38
9-sep	-	-	-	-	44	36
9-sep	-	-	-	-	43	47
10-sep	-	-	-	-	42	69
10-sep	-	-	-	-	38	22
10-sep	-	-	-	-	35	31
10-sep	-	-	-	-	41	19
10-sep	-	-	-	-	34	23
10-sep	-	-	-	-	36	37
10-sep	-	-	-	-	44	13
11-sep	-	-	-	-	38	133
11-sep	-	-	-	-	52	63
11-sep	-	-	-	-	38	33
11-sep	-	-	-	-	39	82
11-sep	-	-	-	-	45	42
11-sep	-	-	-	-	44	53
11-sep	-	-	-	-	42	37
11-sep	-	-	-	-	42	37
11-sep	-	-	-	-	43	29
11-sep	-	-	-	-	42	49
11-sep	-	-	-	-	28	42
11-sep	-	-	-	-	35	203
14-sep	-	-	-	-	40	148
14-sep	-	-	-	-	45	169
14-sep	-	-	-	-	45	108
14-sep	-	-	-	-	45	46
14-sep	-	-	-	-	48	34
14-sep	-	-	-	-	43	40
14-sep	-	-	-	-	41	23
15-sep	-	-	-	-	37	58
POSITIVO:	+			PROMEDIO:	41,60	51,57
NEGATIVO:	-			DESV-ESTAND:	5,71	40,71

ANEXO N° 3

ESPECIE:	TRUCHA
NUMERO:	44
INOCULACION:	7-ago

GRAM							
FECHA	HIGADO	BAZO	RIÑON	GIEMSA	HEMATOCRITO	PESO (gr)	
12-ago	-	-	-	-	42	76	
20-ago	-	-	-	-	37	65	
20-ago	-	-	-	-	50	64	
26-ago	-	-	-	-	55	84	
3-sep	-	-	-	-	28	59	
3-sep	-	-	-	-	29	107	
3-sep	-	-	-	-	31	110	
3-sep	-	-	-	-	43	94	
3-sep	-	-	-	-	36	82	
8-sep	-	-	-	-	45	115	
8-sep	-	-	-	-	40	88	
8-sep	-	-	-	-	52	90	
8-sep	-	-	-	-	48	95	
8-sep	-	-	-	-	47	110	
9-sep	-	-	-	-	48	118	
9-sep	-	-	-	-	48	91	
9-sep	-	-	-	-	45	103	
9-sep	-	-	-	-	50	110	
9-sep	-	-	-	-	51	88	
9-sep	-	-	-	-	49	115	
9-sep	-	-	-	-	54	89	
9-sep	-	-	-	-	40	97	
9-sep	-	-	-	-	38	101	
9-sep	-	-	-	-	45	109	
9-sep	-	-	-	-	42	94	
9-sep	-	-	-	-	44	95	
9-sep	-	-	-	-	46	100	
11-sep	-	-	-	-	47	122	
11-sep	-	-	-	-	45	103	
11-sep	-	-	-	-	48	105	
11-sep	-	-	-	-	36	103	
11-sep	-	-	-	-	41	90	
11-sep	-	-	-	-	36	108	
11-sep	-	-	-	-	33	124	
11-sep	-	-	-	-	51	45	
14-sep	-	-	-	-	47	110	
14-sep	-	-	-	-	45	94	
14-sep	-	-	-	-	48	102	
14-sep	-	-	-	-	42	113	
14-sep	-	-	-	-	46	95	
15-sep	-	-	-	-	43	114	
15-sep	-	-	-	-	44	90	
15-sep	-	-	-	-	45	93	
15-sep	-	-	-	-	52	97	
POSITIVO:	+				PROMEDIO:	43,91	96,75
NEGATIVO:	-				DESV-ESTAND:	6,41	16,57

ANEXO N° 4

ESPECIE:	contol
NUMERO:	15
INOCULACION:	7-ago

FECHA	GRAM			GIEMSA	HEMATOCRITO	PESO (gr)
	HIGADO	BAZO	RIÑON			
14-sep	-	-	-	-	44	27
14-sep	-	-	-	-	50	26
14-sep	-	-	-	-	46	37
14-sep	-	-	-	-	38	22
14-sep	-	-	-	-	42	123
14-sep	-	-	-	-	44	25
14-sep	-	-	-	-	44	25
14-sep	-	-	-	-	46	34
14-sep	-	-	-	-	44	28
14-sep	-	-	-	-	47	32
14-sep	-	-	-	-	48	125
14-sep	-	-	-	-	42	109
14-sep	-	-	-	-	52	103
14-sep	-	-	-	-	47	118
14-sep	-	-	-	-	48	139

POSITIVO:	+
NEGATIVO:	-

PROMEDIO:	45,47	64,87
DESV-ESTAND:	3,48	46,94

ANEXO N°5**GRAM:**

Materiales:

Cristal
Violeta.
Lugol.
Alcohol.
Safranina.

Técnica:

- a.- Fijar el extendido de sangre u órgano en un portaobjeto.
- b.- Cubrir el portaobjeto con cristal violeta por 2 minutos.
- c.- Lavar con agua corriente.
- d.- Cubrir el portaobjeto con lugol por 1 minutos
- e.- Lavar con agua corriente.
- f.- Cubrir el portaobjeto con alcohol por 30 segundos.
- g.- Lavar con agua corriente.
- h.- Cubrir el portaobjeto con safranina por 15 segundos.

ANEXO N°6

GIEMSA:

Materiales:

Giemsa comercial.
Metanol neutralizado.
Buffer fosfato a un ph 6.8

Preparación de buffer:

Solución A: pesar 9.08 gr de KH_2PO_4 y llevar a 1000 ml con agua destilada.

Solución B: pesar 9.11 gr de Na_2HPO_4 y llevar a 1000 ml con agua destilada.

Para obtener un buffer de ph 6.8:

Mezclar: 50.8 ml de solución A +
49.2 ml de solución B.

Técnica:

a.- Colocar el frotis en un vaso coplin con metanol por 5 minutos para fijar el extendido de sangre u órgano.

b.- Traspasar el frotis a otro vaso coplin con Giemsa diluido (2 gotas por ml de buffer ph 6.8) y dejarlo en tinción por 40 minutos.

c.- Sacar y lavar en agua corriente por 4-5 segundos y secar al aire.

ANEXO N°7**IFATU2.**

Técnica:

- a.- Desgrasar los portaobjetos en Acetona durante 10 minutos y secar al aire.
- b.- Extender la muestra sobre el portaobjeto.
- c.- Secar al aire la muestra y fijarlas en Acetona por 5 minutos, este paso ayuda a disminuir la fluorescencia no específica debido a que remueve los lípidos de la muestra.
- d.- Depositar 1 o 2 gotas de la dilución de trabajo (10^3 en PBS) del Ac. anti - U2 de conejo e incubar en una cámara húmeda por 60 minutos a temperatura ambiente.
- e.- Lavar la muestra con PBS (ph 7.0) y luego sumergirlos en el mismo PBS por 5 minutos.
- f.- Aplicar 1 o 2 gotas de la dilución de trabajo del segundo Ac anti-anti U2 e incubar en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- g.- Lavar la muestra por 10 minutos en agitación con PBS (ph 7.0).
- h.- Mantener por 15 minutos la muestra en la tinción de contraste Azul de Evans' (0.1% en PBS).
- i.- Lavar con PBS (ph 7.0) y luego sumergirlos en el mismo PBS por 5 minutos.
- j.- Agrega una gota del fluido de montaje (ph 8.6) y tapar con cubreobjeto.
- k.- Ver la muestra usando aceite de inmersión en microscopio de fluorescencia.

Soluciones:

-0.01MPBS(ph 7.0)

- Solución A: 0.2M NaH_2PO_4 (NaH_2PO_4 - H_2O - 29 gr/l)

- Solución B: 0.2M (NaH_2PO_4 - $7\text{H}_2\text{O}$ - 53.7gr/l)

Combinar 16.5 ml de solución A, 33.5 ml de solución B, 7.4 gr NaCl y completar 1 litro con agua destilada.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que colaboraron en esta investigación, en especial a:

- Dr. Ricardo Enriquez, profesor patrocinante de esta tesis, por su valiosa colaboración.
- Personal del laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias: Sr. Carlos Farias (Med. Veterinario); Sra. Mónica Morirás (Tec. Médico); Sra. Mónica Gonzáles y Sr. Esteban Henríquez.
- Personal de la Biblioteca de la Universidad de Talca, en especial al señor Samuel Bravo.

Al padre Alejandro y Sra. Angela Utreras por la buena voluntad de tenerme en su hogar.

- Quisiera también agradecer a mi polola Sandra Jerez, por su continuo apoyo y paciencia.
- Finalmente y en forma muy especial quiero agradecer a mi familia y amigos por su continuo apoyo, cariño y preocupación.