



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

**Caracterización bioquímica, electroforetica y sensibilidad  
antibiótica de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas desde  
Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)**

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

**Francisco Rodrigo Concha Alberti**  
**Valdivia Chile 1998**

PROFESOR PATROCINANTE

D. Ricardo Enriquez

Nombre



Firma

COPATROCINANTE

Hugo Fidal

Nombre

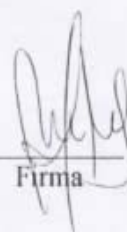


Firma

COLABORADOR

Prionica Prousa's

Nombre



Firma

## INDICE GENERAL

<b>MATERIA</b>	<b>PAGINA</b>
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
4. MATERIAL Y METODO.....	8
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSION.....	21
7. BIBLIOGRAFIA.....	30
8. ANEXOS.....	36
9. AGRADECIMIENTOS.....	40

## 1. RESUMEN

Desde el primer brote por *Yersinia ruckeri* en 1991 que afectó la industria comercial de salmón, esta bacteria ha generado pérdidas económicas importantes debido a mortalidades en alevines de salmón del atlántico (*Salmo salar*) y también por el uso de vacunas y antimicrobianos en su control. Lo anterior ha motivado el presente estudio, con el objetivo de caracterizar *Y. ruckeri* bioquímicamente, electroforéticamente y determinar su comportamiento frente a los antimicrobianos más corrientemente utilizados.

En este estudio fueron analizadas 18 cepas, incluyendo una cepa tipo (ATCC 29473), aisladas de salmón del atlántico entre junio de 1993 a mayo de 1996, colectadas de pisciculturas de la Xa región.

Algunos de los aislados analizados presentaron similitud bioquímica con la cepa tipo. Otras cepas contrariamente, mostraron diferencias bioquímicas, particularmente la ausencia de motilidad y de hidrólisis de tween 80, grupo claramente definido dentro de los aislados chilenos. Además, la fermentación del sorbitol fue positiva en cepas de serotipo I y II.

El análisis electroforético de los aislados por SDS-PAGE mostró 12 bandas proteicas con un rango de pesos moleculares de 18 a 97 kDa. Basado en la migración proteica, tres grupos definidos fueron detectados. Sin embargo, no fue posible establecer una relación entre estos grupos electroforéticos con los grupos pertenecientes a cepas móviles o inmóviles, cepas resistentes a antimicrobianos o diferentes variedades serológicas de la bacteria.

Acido oxolínico, fue el único antimicrobiano al cual las cepas resultaron resistentes (27,7% de los aislados) e incluyen cepas móviles e inmóviles. Todas las cepas fueron sensibles a oxitetraciclina, flumequina, florfenicol y sulfametoxazol - trimetoprim.

Palabras claves : *Yersinia ruckeri*, caracterización bioquímica, resistencia antibiótica, electroforesis - SDS, salmón del atlántico.

## 2. SUMMARY

Since the first outbreak of *Yersinia ruckeri* in 1991 which affected the commercial salmon industry, this bacterium has generated important economic losses due to the mortalities in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry and also to the use of vaccines and antimicrobials for its control. This has motivated the present study which objectives is to characterize biochemically, electroforetically and also to determine its behavior against the most currently used antimicrobials

In this study 18 strains were analyzed including the type strain (ATCC 29473), isolated from Atlantic salmon between June of 1993 to May of 1996, samples were collected in fish farms in the 10 region.

Some of the isolate analyzed showed biochemically similar to the type strain (Hagerman strain). Other strains on the contrary, showed biochemical differences, particularly the absence of mobility and hydrolyze of tween 80, group clearly defined within the Chilean isolates. In addition, the fermentation of the sorbitol was positive in strains of serotype I and II.

In relationship to the characterization of the proteinic components analyzed through the electroforetic in gels of polyacrylamide - SDS, it was determined 12 different proteinic bands with molecular weights that go of 18 kDa to 97 kDa, being defined 3 groups according to proteinic migration , these group could not be associated with mobile or immobile strains, strain resistant to antimicrobials or different serological varieties .

Oxolinic acid, it was the only antimicrobials to which the strains resulted resistant (27,7%), being presented in mobile and immobile strains, for the case of oxytetracycline, flumequine, florfenicol and sulfametoxazol - trimetoprim the strains resulted sensitive.

Key words : *Yersinia ruckeri*, electroforetic, - SDS, Atlantic salmon.

### 3. INTRODUCCION

La salmonicultura en Chile como actividad productiva a escala comercial se origina en la década de los 80, consolidándose a través de los años como un área de gran importancia económica (Méndez y Munita, 1989). De esta manera, actualmente es el segundo productor mundial después de Noruega con una producción de 142.986 toneladas de salmonídeos de los cuales 58 % corresponde a salmón del atlántico (*Salmo salar*), en el período comprendido entre enero-noviembre de 1997, lo que generó divisas por 595.755 millones de dólares (Vidal, 1998).

Este crecimiento no sólo se ha reflejado en cifras de exportaciones, utilidades e inversiones, sus dimensiones sociales se hacen cada vez más palpables y necesarias, generando alrededor de 17.500 empleos en forma directa y aproximadamente 8.000 más en forma indirecta en empresas ubicadas entre las X y XII regiones (Infante, 1996).

Haciendo una evaluación objetiva de la realidad acuícola nacional, se puede observar que la industria salmonera carece de importantes elementos de sostén como; laboratorios de referencia, estandarización en técnicas diagnósticas, unificación de criterios diagnósticos en el ámbito nacional y otros (Bustos, 1998), que deben ser considerados como un gran desafío, ya que, en el contexto mundial la situación chilena es cada vez menos ventajosa (Bustos, 1996). En este sentido, Campos (1995) asevera que el futuro de la industria va a depender en gran medida, de la prevención y control que se realice sobre las enfermedades.

En el cultivo de peces, las manifestaciones de brotes de enfermedad están determinadas por factores tales como: las altas densidades de cultivo, las tasas de contacto entre huésped y patógeno, el estrés del manejo productivo, las variaciones estacionales en la temperatura del agua, la resistencia natural de los peces y el estado inmune de la población (Busch, 1982; Solervicens, 1995).

Por otra parte, en relación con agentes bacterianos las compañías salmoneras se encontraban en un lugar de privilegio respecto a países competidores, sin embargo, estimaciones hechas en la actualidad responsabilizan a los cuadros bacterianos como los causantes del 42 % de las pérdidas totales en el ciclo de producción, las que para el año 1997 fueron calculadas en US\$ 164 millones (Bustos, 1998).

Una de las principales enfermedades bacterianas en la salmonicultura mundial es la Enfermedad Entérica de la Boca Roja (ERM = Enteric Redmouth Disease), que en los años 50 estuvo asociada con alta mortalidad en pisciculturas de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Valle de Hagerman, Idaho (Davies y Frerichs, 1989; Rodgers, 1991). En 1966 Ross (Wobeser, 1973) describió por primera vez la bacteria asociada a esta condición patológica, la cual fue denominada como *Yersinia ruckeri* (Ewing y col., 1978; Bergey<sup>1</sup> S Manual, 1986).

La Enfermedad Entérica de la Boca Roja es una infección sistémica de curso agudo a crónico que afectó primariamente a la trucha arcoiris (*O. mykiss*), aunque todos los salmonídeos y algunas especies no salmón. En Chile, el salmón del atlántico (*S. salar*) es el más afectado, siendo susceptibles stocks nacionales e importados. Cabe mencionar además que para el caso de la trucha arcoiris (*O. mykiss*) nacional o importada aún cuando en esta se ha detectado la presencia del patógeno, no se ha informado del desarrollo del cuadro clínico (Enríquez, 1998<sup>1</sup>).

En infecciones crónicas la Enfermedad Entérica de la Boca Roja produce pérdidas relativamente bajas las que pueden llegar a ser dramáticamente altas cuando las condiciones del agua son inadecuadas o cuando los peces son expuestos a condiciones de estrés (Inglis y col., 1993).

*Yersinia ruckeri*, es un bacilo gram negativo corto (1.5-2.0 um por 0,5 um) que se observa sólo o asociado en pequeñas cadenas. Estudios con hibridación de ADN y determinación de la relación citocina - guanina confirman que el microorganismo pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Bullock y col., 1978; Austin y col., 1982). Por otra parte, la presencia de flagelación peritrica le confiere a *Y. ruckeri* la característica de motilidad, la cual está relacionada con la temperatura de incubación. Es así como son móviles aquellas cultivadas entre 18 a 27 °C. A 9 °C los flagelos están presentes pero no son funcionales, encontrándose totalmente atenuados a 35°C con completa pérdida de motilidad. Cabe mencionar además, que la temperatura óptima de crecimiento para esta bacteria se encuentra entre los 22 y 25 °C (O'Leary y col., 1979; Furones y col., 1993).

El número y rango geográfico de los aislados de *Y. ruckeri* indican que es común en peces y ambientes acuícola, estando los brotes de la enfermedad relacionada con cultivos intensivos (Inglis y col., 1993). La diseminación de esta patología se debió en gran medida a la falta de programas de control, además de que en el estado subclínico es altamente infecciosa y de fácil transmisión (Mc Daniel, 1971).

---

<sup>1</sup> Comunicación personal. Dr. Ricardo Enríquez.  
Ictiopatología. Universidad Austral de Chile.

Esta transmisión de tipo horizontal no necesita el contacto directo entre los peces, ya que la bacteria se transmite a través del agua (Alvarado, 1990).

En el cuadro clínico los peces aparecen letárgicos de color oscuro y frecuentemente exhiben una condición debilitada debido a la anorexia, pudiendo desarrollar en algunas ocasiones procesos hemorrágicos alrededor de la boca, mandíbula y opérculo (Furones y col.,1993). También pueden presentar exoftalmia y ceguera producto de la ruptura de la córnea. Internamente, se describen hemorragias en el bazo, ciegos pilóneos, tejido adiposo, vejiga natatoria y tejido muscular. El intestino posterior se encuentra sin alimento y puede presentar un aspecto distintivo en algunos casos con material acuoso o mucoide amarillento (Austin y Austin., 1989; Rodgers, 1991).

Actualmente, la Enfermedad Entérica de la Boca Roja ha sido referida como "Yersiniosis" debido a que a menudo las características áreas enrojecidas alrededor de la boca y opérculo no aparecen en los peces afectados sin observarse como la clásica "boca roja" (Frerichs y col., 1985; Inglis y col., 1993).

Las subdivisiones de *Yersinia ruckeri* se basan en reacciones serológicas reconociéndose 6 serotipos: el I o de Hagerman; el I' o Salmonid Blood Spot (SBS); el II o O'Leary; el III o Australiano; el IV que fue excluido ya que por hibridación de DNA se determinó que no correspondía al género *Yersinia*; el V o de Colorado y finalmente el serotipo VI o de Ontario (Daly y col., 1986, Inglis y col., 1993).

La mayoría de los brotes de Yersiniosis son causados por cepas del serotipo I o Hagerman, pero también han ocurrido cuadros clínicos producidos por los serotipos I', II, III y V (De Grandis y Stevenson., 1985; Daly y col., 1986).

En Chile, el primer aislamiento de *Yersinia ruckeri* fue realizado en 1983 desde el intestino de una carpa común (*Cyprinus carpio*) capturada en el río Valdivia (Enríquez y Zamora, 1987). En los cultivos comerciales de salmón fue detectada en el año 1991 y a partir de esa fecha ha estado presente tanto en lagos como en pisciculturas de la X región. Mayoritariamente los aislamientos han sido de cepas serotipo I detectándose sólo en forma ocasional el serotipo II (Enríquez, 1997<sup>2</sup>).

Como medio de cultivo para *Yersinia ruckeri*, se ha utilizado el agar de soya triptícase (TSA) en donde las colonias crecen, normalmente con un diámetro de 1 a 2 mm, redondas, lisas, ligeramente convexas y con bordes completos. Estas colonias no presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta pero pueden aparecer ligeramente

---

<sup>2</sup> Comunicación personal. Dr. Ricardo Enríquez.  
Ictiopatología. Universidad Austral de Chile.



iridiscentes al reflejo de la luz. A la luz natural son translúcidas con un color blanco cremoso, el olor producido durante el crecimiento en este medio, es distintivo y único entre los patógenos bacterianos de los peces (Busch y Lingg, 1975; Austin y col., 1982; Busch, 1982; Furones y col., 1993). La bacteria crece tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas en cualquiera de los medios primarios enriquecidos, dentro de un rango de pH entre 6.5 a 7.7, en un tiempo que va desde las 12 a 96 horas (Amend y col., 1983). En relación con el crecimiento de *Y. ruckeri* en otros medios de cultivo Ewing y col. (1978) determinaron que el 100 % de los aislados crece en agar Mac Conkey, el 88 % crece en agar Samonella Shigella, 56 % en agar bilis Verde Brillante y no crece en agar Bilis Verde Brillante enriquecido con selenito.

En casos clínicos de Yersiniosis el diagnóstico se realiza a través del reconocimiento de la signología junto al aislamiento de *Y. ruckeri* desde órganos como riñón, hígado o cerebro (Shorts y Nemetz, 1993). En el caso de portadores asintomáticos la muestra debe tomarse desde el intestino posterior para su siembra en TSA, incubación a 20-24 °C por 48 horas y posterior reconocimiento de la morfología típica de las colonias (Busch y Lingg, 1975; Bullock y Snieszko, 1979; Mc Daniel, 1979; Noga y col., 1988). El diagnóstico presuntivo de la enfermedad está basado en la aislamiento inicial de un bacilo gram negativo y citocromo oxidasa negativo (Busch, 1982). La confirmación diagnóstica se realiza a través del uso de antisueros específicos en pruebas de aglutinación en placa y en procedimientos con fluorescencia (Mc Daniel, 1979; Barja y Toranzo, 1988).

Para la caracterización bioquímica de este agente se han utilizado los métodos convencionales y nuevas herramientas diagnósticas como el sistema API-20E, sin embargo, API-20E en muchos casos no discrimina entre *Yersinia ruckeri* y la enterobacteria *Hafnia alvei* (Austin y Austin, 1989; Romalde y Toranzo, 1991). Bioquímicamente, *Yersinia ruckeri* se describe como un grupo homogéneo en sus características. Es un microorganismo con metabolismo fermentativo, positivo a pruebas como motilidad, rojo-metilo, degradación de gelatina y tween 80, reducción de nitratos, producción de ácido a partir de maltosa, manitol, trehalosa, glicerol y negativo a citocromo oxidasa, voges-proskauer, desaminación de la fenilalanina, degradación de esculina, gas de glucosa, fluorescencia, producción de indol, producción de hidrogeno sulfurado en TSI, producción de ácido a partir de lactosa, sacarosa, inositol, arabinosa, sorbitol, salicina, rhamnosa y xilosa (Wobeser, 1973; Ewing y col., 1978; O'Leary y col., 1979; Stevenson y Daly, 1982; Austin y Austin, 1989; Davies y Frerichs, 1989; Furones y col., 1993). Sin embargo, se han reportado resultados variables en algunas pruebas como rojo-metilo, voges-proskauer, motilidad a 25°C, liquefacción de la gelatina, fermentación del sorbitol y arabinosa (Stevenson y Daly, 1982).

El control de Yersiniosis en salmonídeos de cultivo se realiza a través de vacunaciones y agentes antimicrobianos, unido a condiciones de cultivo y manejo adecuados. Desgraciadamente, las vacunaciones no dan un 100% de protección y el uso de antibióticos aún es requerido en ciertas circunstancias (Rodgers, 1991). Oxitetraciclina, ácido oxolínico y sulfamerazina se utilizan para tratar la enfermedad, los cuales pueden controlar el problema, pero su uso a la vez causa una serie de desventajas, tales como desarrollo de resistencia bacteriana, recurrencia de nuevos brotes y altos costos (De Grandis y Stevenson, 1985; Johnson, 1989; Rodgers, 1991). Los errores más comunes detectados que predisponen a la aparición de cepas resistentes se refieren a los siguientes aspectos: tratamientos no avalados por pruebas de sensibilidad, bajas dosis, interrupción o disminución del tiempo mínimo recomendado, errores de cálculo, uso reiterativo de un solo antibiótico (Jarpa, 1990).

Con la finalidad de que se contribuya en determinar el comportamiento de este patógeno en nuestro ecosistema, para lo cual se caracterizó aislados nacionales de *Yersinia ruckeri* bioquímicamente, electroforéticamente y se determinó su comportamiento frente a los antibióticos actualmente de mayor uso en Chile, se realizó el presente estudio.

## 4. MATERIAL Y METODO

### 4.1 MATERIAL.

#### 4.1.1 Material Biológico.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. Para esto, se utilizaron 18 cepas de *Yersinia ruckeri* (Tabla 1) pertenecientes al cepario de la Unidad, las cuales fueron confirmadas serológicamente por aglutinación rápida en placa. Los aislamientos se efectuaron desde salmón del atlántico (*Salmo salar*) afectados clínicamente, muestreados entre junio de 1993 a mayo de 1996, desde centros de cultivo en la Xa región.

**TABLA N° I.** Cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas desde salmón del atlántico (*Salmo salar*) indicando serotipo, fecha y lugar de aislamiento.

Cepa	Serotipo	Fecha de aislamiento	Lugar de aislamiento
1	I	15/11/1993	Lago Llanquihue
2	I	13/01/1994	Mar
3	I	21/04/1995	Lago Llanquihue
4	I	27/12/1994	Lago Llanquihue
5	I	21/11/1995	Lago Llanquihue
6	I	10/06/1993	Mar
7	I	09/12/1994	Lago Llanquihue
8	I	29/12/1995	Lago Llanquihue
9	I	09/04/1996	Lago Rupanco
10	I	31/11/1995	Lago Llanquihue
11	I	10/11/1995	Lago Llanquihue
12	I	26/12/1994	Lago Llanquihue
13	I	18/03/1995	Lago Rupanco
14	I	11/04/1996	Mar
15	I	31/10/1995	Mar
16	I	14/03/1995	Lago Rupanco
17	I		ATCC (29473)
18	II	10/04/1995	Lago Llanquihue

#### 4.1.2 Material de laboratorio

El material utilizado para realizar las pruebas bioquímicas y sensibilidad antibiótica, es el de uso rutinario en el laboratorio de diagnóstico Ictiopatológico. Por otra parte, la electroforesis de los componentes proteicos de *Y. ruckeri* se efectuó en el Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile.

##### 4.1.2.1 Caracterización bioquímica.

Se preparó la siguiente batería de 26 pruebas bioquímicas estandarizadas.

- Citocromo Oxidasa.
- Oxidación/Fermentación de la glucosa.
- Motilidad en medio semi-sólido.
- Reducción de Nitratos.
- Producción de Indol.
- Producción de Hidrógeno Sulfurado (H<sub>2</sub>S en tiras de acetato de plomo).
- Prueba de Rojo-Metilo.
- Prueba de Voges-Proskauer.
- Prueba de la Desaminación de la Fenilalanina.
- Gas de Glucosa.
- Fluorescencia.
- Degradación de :
  - Esculina.
  - Gelatina.
  - Tween 80.
- Producción/ácido de:
  - Salicina.
  - Trehalosa.
  - Sacarosa.
  - Lactosa.
  - Xilosa.
  - Manitol.
  - Glicerol.
  - Sorbitol
  - Maltosa.
  - Inositol.
  - Arabinosa.
  - Rhamnosa.

#### 4.1.2.2 Caracterización Electroforética.

La electroforesis se efectuó a través de geles de Poliacrilamida - SDS.

#### 4.1.2.3 Sensibilidad Antibiótica.

Se utilizó agar Müeller-Hinton y sensidiscos cuya concentración se describe en la Tabla 2.

**TABLA Nº 2.** Antibióticos y concentración utilizada para la prueba de sensibilidad.

<b>Antibióticos</b>	<b>Concentración (µg)</b>
Ac. Oxolínico	2
Oxitetraciclina	30
Flumequina	30
Florfenicol	30
Sulfametoxazol-Trimetoprim	25

## 4.2 METODO

### 4.2.1 Obtención de las cepas.

Cada cepa identificada adecuadamente, se sembró en TSA (agar de Soya Tripticasa) por 24 a 48 horas a 22°C, una vez obtenido un buen crecimiento de las colonias se efectuaron las pruebas bioquímicas y se determinó la sensibilidad antibiótica, además, se multiplicó cada cepa en cinco placas de TSA para así poder obtener un pellet que permitiera procesarla por medio de electroforesis.

### 4.2.2 Caracterización bioquímica.

Todas las pruebas se realizaron en tubos según la metodología descrita para cada una de ellas las cuales ya están estandarizadas, incubándose a 22 °C por 48 horas, transcurrido este tiempo se procedió a su interpretación.

### 4.2.3 Caracterización Electroforética.

#### 4.2.3.1 Obtención de Proteínas de *Yersinia ruckeri*

La obtención de las proteínas de *Yersinia ruckeri* se realizó mediante el procedimiento descrito por Tabatabai y col (1979) para *Brucella* y modificado por Oñate y Folch (1989). Las bacterias fueron inactivadas por 24 horas en metanol al 60 % p/v, luego fueron lavadas con solución de NaCl al 0.85 % p/v, y centrifugadas a 3500-4000 rpm por 15 minutos, este último paso se repitió tres veces para obtener así bacterias libres del medio de cultivo. Luego las bacterias fueron colocadas en solución salina hipertónica de NaCl 1 M y citrato de sodio 0.1 M y mantenidas durante 24 horas a 4°C. La suspensión se sometió a sonicación (Ultrasonic Homogenizer 4710 series), durante 10 minutos a 60 Watt y luego se centrifugaron a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C (Sorvall RC 28S). Posteriormente con la finalidad de concentrar las proteínas, el sobrenadante se dializó utilizando para ello bolsas de membrana de celulosa regenerada (Cellu Sep tm T3 Regenerated Cellulose Tubular Membrana), con poros de 4.000-6.000 Dalton, procediendo de la siguiente forma:

- Hervir por 5 minutos las bolsas en EDTA al 1 %.
- Lavar con agua destilada para eliminar todo residuo de EDTA.
- Llenado de las bolsas, selladas con hilo e identificadas unitariamente.
- Las muestras se sumergieron en suero fisiológico al 0.4%.
- Se montó el contenedor sobre un agitador magnético de movimiento continuo, por un tiempo de 48 horas, dentro de las cuales se cambió la solución entre 2 a 3 veces al día.

Luego de efectuada la diálisis, con la finalidad de concentrar más las proteínas, cada bolsa que contenía las muestras fue espolvoreada con PEG (Polietilen Glicol). Posterior a esto se centrifugaron a 20.000 r.p.m. por 20 minutos y finalmente las muestras se concentraron durante 2 horas (Speed Vac SC-110). Las proteínas así obtenidas fueron conservadas a -20°C.

#### **4.2.3.2 Determinación de la Concentración de Proteínas de *Yersinia ruckeri*.**

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976). Para lo cual se tomó 1 ml del reactivo con 10 µl de muestra a analizar y se leyó la absorbancia a 595 nm (Shimadzu UV-Visible 120-02), contra un blanco de solución Bradford. Luego se calculó la concentración mediante la lectura de la absorbancia interpolando a una curva de calibración obtenida en el Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

#### **4.2.3.3 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida - SDS.**

Con el objetivo de caracterizar las cepas nacionales a través de los pesos moleculares de sus proteínas, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Dodecil sulfato de sodio) (Sigma Chemical Company). Con un sistema discontinuo de tampones según el método de Laemmli (1970). El gel usado contenía una relación de acril bis acrilamida de 30: 0.8% p/v, el que fue dispuesto entre placas de vidrio de 17 x 15 cm, con espaciadores de 1 mm sellados con glicerina y sujetos por pinzas. Se utilizó un gel separador al 8 % p/v de acril bis acrilamida con tampón Tris - glicina pH 8,8 al 1.5 M, en presencia de SDS al 10% p/v seguido de un iniciador como persulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$  y un catalizador N', N', N', N'-tetrametilendiamina al 99% (TEMED), todos los reactivos usados fueron Sigma Chemicals Co.

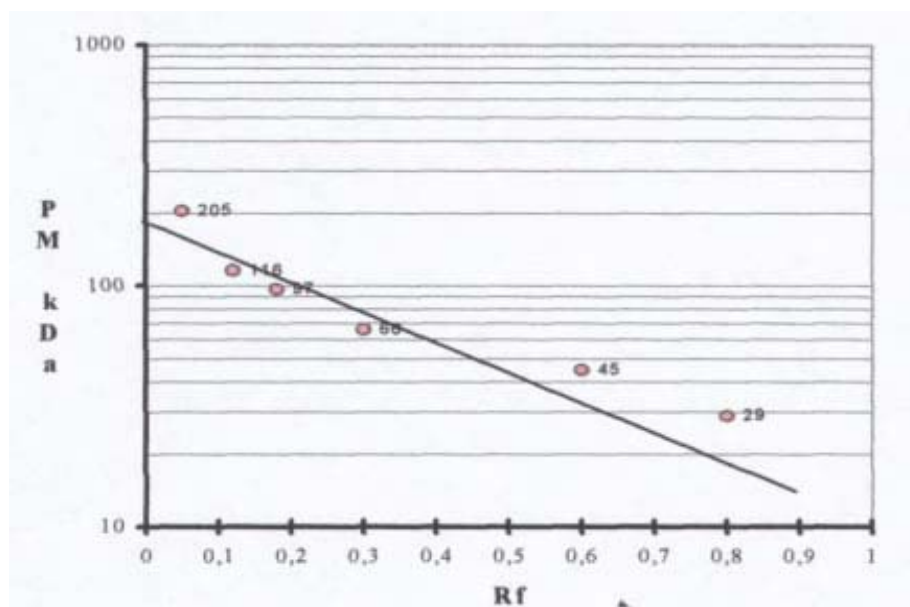
Una vez polimerizado el gel separador, se colocó sobre éste un gel espaciador que contenía 5% p/v de acril bis acrilamida con tampón Tris - glicina pH 6,8 en presencia de SDS al 10% p/v y TEMED al 99% p/v. Antes de polimerizar el segundo gel, se colocó una peineta para así hacer los pocillos sobre los cuales se depositaron las muestras. Previo a la corrida, las muestras de proteínas se prepararon en tampón de Tris - HCl pH 6,8, 0.125 M, SDS 5% p/v, glicerol 25% p/v y 0.05% p/v azul de bromofenol, adicionándole 5% p/v de 2- mercaptoetanol y calentándola a 100 °C por 2 minutos. La electroforesis fue corrida en buffer Tris - glicina pH 8,3 en presencia de SDS al 10 % p/v durante 20 minutos a 15 mA para el gel espaciador y 50 minutos a 20 mA para el gel separador.

#### 4.2.3.4 Tinción de los Geles de Poliacrilamida para Visualizar Proteínas.

Las proteínas obtenidas de *Y. ruchen* fueron corridas en gel de poliacrilamida - SDS, según el procedimiento descrito anteriormente. La visualización se realizó mediante el tratamiento del gel con una solución de tinte que contiene Azul de Coomassie G 0.3 % p/v (Sigma Chemical Co.) en 50 % p/v de metanol y 10 % p/v de ácido acético, en la que se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este período, el gel fue pasado a una solución de desteñido que contiene etanol 70 % p/v y ácido acético 10 % p/v, con lo cual se realizaron varios lavados hasta lograr las bandas de proteínas nítidas.

#### 4.2.3.5 Determinación de los pesos moleculares.

El cálculo de los pesos moleculares se obtuvo a través de un gráfico en base al logaritmo del peso molecular de las proteínas estándares versus Rf, que corresponde a la distancia de migración del colorante. De esta manera se puede calcular en forma aproximada el peso molecular de las proteínas obtenidas en geles de poliacrilamida - SDS (Fig. 1).



**Fig. 1.** Curva de calibración de los estándares de peso molecular conocido en gel de poliacrilamida, obtenido a partir de seis proteínas con los siguientes pesos: Miosina (205 kDa), Galactosidasa (116 kDa), Fosforilasa b (97 kDa), Albúmina de Suero Bovino (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anidrasa Carbónica (29 kDa).



#### 4.2.4 Susceptibilidad antibiótica.

Cada cepa fue procesada según el método de difusión en agar Método de Kirby Bauer (Otth, 1990) con el objetivo de evaluar la respuesta frente a los antibióticos. La suspensión bacteriana se preparó en una solución de suero fisiológico estéril (NaCl 0.85%), con una tórula de algodón hidrófilo estéril se sembró la placa de agar Müller-Hinton en 2 a 3 direcciones, distribuyéndose homogéneamente sobre la superficie del agar, posteriormente se aplicaron los sensidiscos incubándose por 18 horas a 20-25 °C.

Al momento del cálculo de los halos de inhibición de cada cepa, se procedió realizando tres mediciones, de manera que el resultado final que fue un promedio de dichos valores se comparó con los halos de inhibición estándares descritos en la Tabla 3.

**TABLA N° 3.** Halos de inhibición estándares descritos según resistencia, sensibilidad intermedia v sensibilidad total.

Agente Antimicrobiano *	Sigla	Resistente (R)	Intermedio (I)	Sensible (S)
Ac. Oxolínico	AOX	≤10 mm		≥ 11 mm
Oxitetraciclina	OXT	≤14 mm	15- 18 mm	≥ 19 mm
Flumequina	UB	≤16 mm	17- 19 mm	≥ 20 mm
Florfenicol	FFC	≤16 mm	17 - 20 mm	≥ 21 mm
Sulfametoxazol-Trimetoprin	SX-TR	≤10 mm	11 - 15 mm	≥ 16 mm

\* Fecha de vencimiento Octubre 1997.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA.

En la Tabla 4, se presentan las características bioquímicas de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas de salmón del atlántico (*S. salar*) desde Junio de 1993 a Mayo de 1996, muestreadas en la Xa región.

**TABLA N° 4.** Características bioquímicas de cepas de *Y. ruckeri* aisladas desde salmón del atlántico (*S. salar*), cultivadas por 48 horas a 22 °C.

Pruebas Bioquímicas	CEPAS																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Citocromo Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxid/Ferm. de la glucosa	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Mot. en medio semi-sólido	M	M	M	I	M	M	I	I	I	I	I	I	I	M	I	M	M	M
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prod.de H <sub>2</sub> S (acetato de plomo)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Prueba de rojo-metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de voges-proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. de Des. De la Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas de glucosa	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Fluorescencia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación de:																		
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Producción /ácido de:																		
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabmosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

F: Fermentador M: Móvil I: Inmóvil +: Positivo -: Negativo ATCC: 17 Serotipo II: 18

De la Tabla 4, se desprende que las 17 cepas de *Yersinia ruckeri* analizadas, evidenciaron metabolismo fermentativo de la glucosa, además fueron positivas a: Reducción de nitratos, rojo-metilo, voges-proskauer, degradación de gelatina, producción ácido de trehalosa, manitol, glicerol y maltosa. Por otra parte, fueron negativas en relación a : citocromo oxidasa, producción de indol, desaminación de la fenilalanina, fluorescencia, degradación de esculina, producción ácido de salicina, sacarosa, lactosa, xilosa, inositol, arabinosa y rhamnosa.

Además, se observa que todas las cepas móviles fueron capaces de hidrolizar el tween 80 y las cepas inmóviles presentaron la reacción inversa.

Por otra parte, las cepas 10, 13 y 18 presentaron positividad a la reacción de fermentación del sorbitol.

## 5.2 ANALISIS ELECTROFORETICO.

La caracterización electroforética en gel de poliacrilamida - SDS de los componentes proteicos en las cepas de *Yersinia ruckeri* analizadas, definió 12 bandas proteicas cuyos pesos moleculares fueron de: 97, 63, 60, 58, 50, 40, 37, 33, 29, 26, 20 y 18 kDa (Fig. 2 y 3), calculados mediante una curva de calibración (Figura 1).

Según las bandas obtenidas en la electroforesis se aprecian tres grupos definidos según la migración proteica. El primero, constituido por las cepas 3, 5, 8, 10 y 18, con 8 a 9 bandas que presentaron pesos moleculares de: 18, 20, 26, 29, 40, 58, 60, 63 y 97 kDa. El segundo grupo, conformado por las cepas 4, 7, 9, 11, 12, 13, 15 y 16, presentó 4 y 5 bandas proteicas con pesos moleculares de: 26, 33, 37, 40 y 50 kDa. Finalmente, las cepas 1, 2, 6 y 14 presentaron 4 bandas proteicas con pesos moleculares de 26, 33, 37 y 40 kDa.

La cepa ATCC (29473) mostró 5 bandas con pesos moleculares de: 26, 29, 31, 37 y 40 kDa.

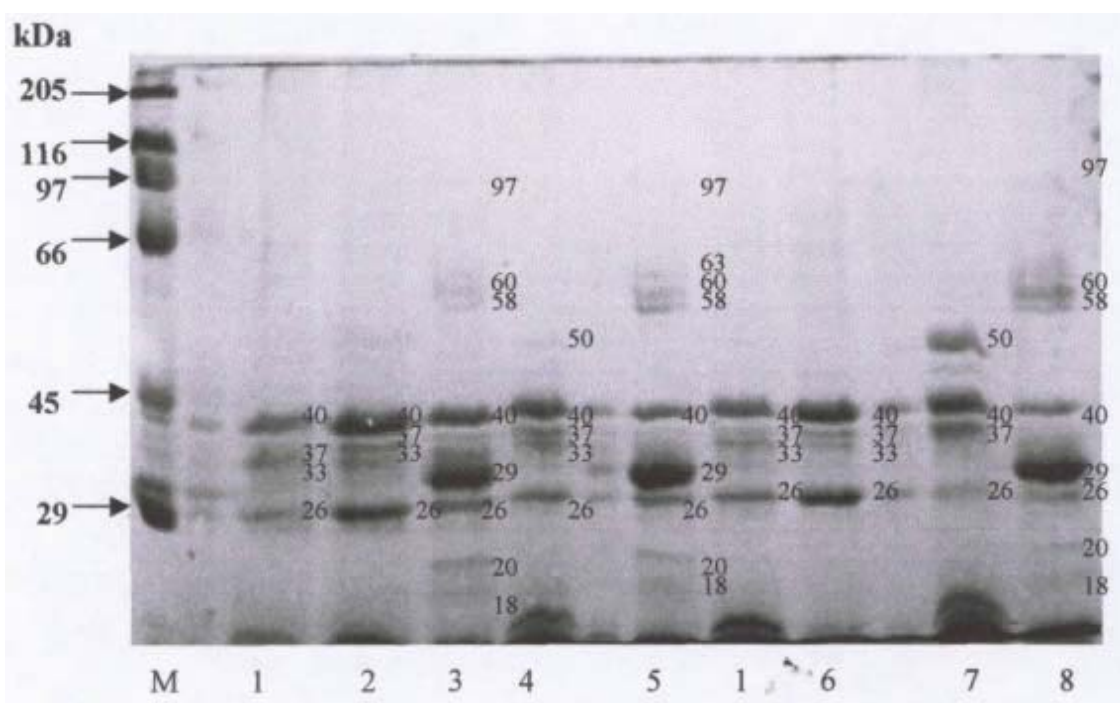


Fig. 2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida - SDS.

M: Proteínas estándares.

1 a 8: Proteínas de *Yersinia ruckeri* aisladas de terreno.

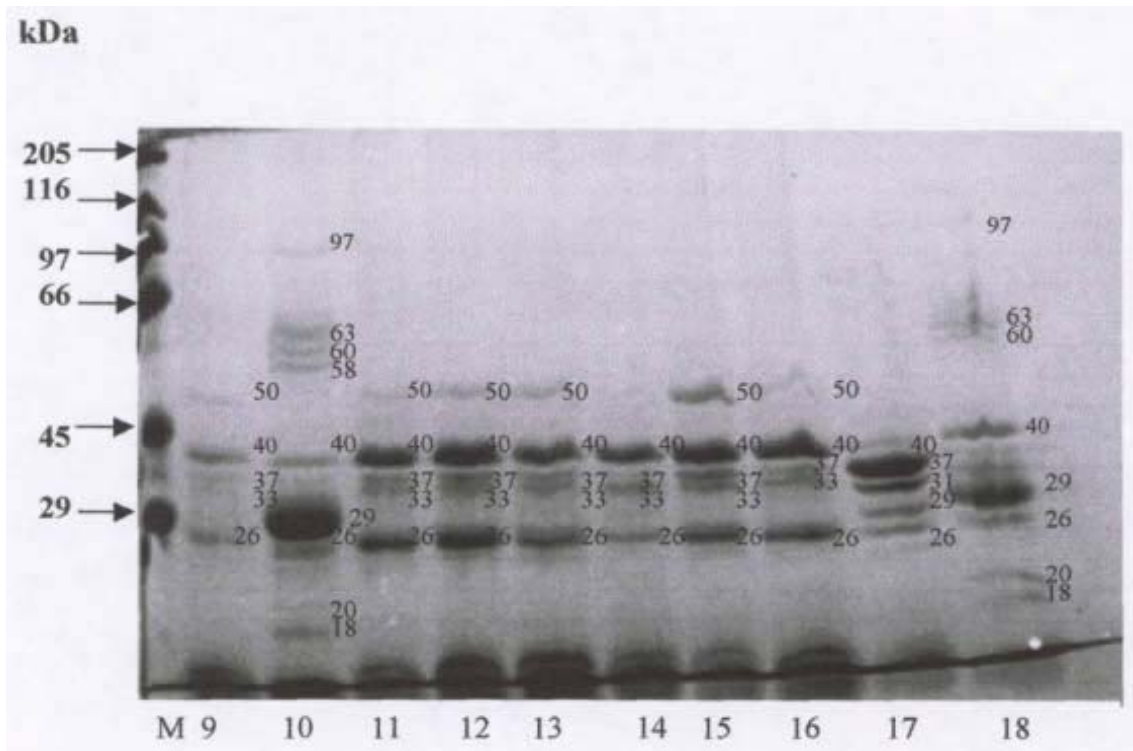


Fig. 3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

M: Proteínas estándares.

9a 16: Proteínas de *Yersinia ruckeri* aisladas de terreno.

17: Ceba *Yersinia ruckeri* ATCC.

18: Ceba *Yersinia ruckeri* aislada de terreno (serotipo II).

### 5.3 ANALISIS SENSIBILIDAD ANTIBIOTICA.

La Tabla 5, muestra la susceptibilidad de las cepas de *Yersinia ruckeri* frente a antibióticos de uso común en la salmonicultura nacional.

**TABLA N° 5.** Sensibilidad de *Yersinia ruckeri* a cinco antibióticos, cultivadas por 18 horas a 20-25 °C.

Cepas	Antibióticos				
	OXT 30 µg	SX-TR 25 µg	FFC 30 µg	AOX 2 µg	FQ 30 µg
1	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	S
5	S	S	S	R	S
6	S	S	S	S	S
7	S	S	S	R	S
8	S	S	S	R	S
9	S	S	S	R	S
10	S	S	I	R	S
11	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S
16	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S
18	S	S	S	S	S

OXT, oxitetraciclina; SX-TR, sulfametoxazol - trimetoprim;

FFC, florfenicol; AOX, ácido oxolínico; FQ, flumequina.

R : Resistente; I: Sensibilidad intermedia; S : Sensible.

De la Tabla 5, se desprende que la totalidad de las cepas de *Yersinia ruckeri* analizadas, mostraron sensibilidad a la oxitetraciclina, a .sulfametoxazol - trimetoprim y flumequina.

La cepa 10, presentó sensibilidad intermedia frente a florfenicol. Por otra parte, las cepas 5, 7, 8, 9 y 10 presentaron resistencia frente al quimioterápico ácido oxolínico.

La cepa 18, mostró sensibilidad a la totalidad de los antibióticos utilizados.

En la Tabla 6, se presenta el grado de sensibilidad de las cepas de *Yersinia ruckeri* en relación con los antibióticos utilizados.

**TABLA N° 6.** Grado de sensibilidad de *Yersinia ruckeri* frente a antibióticos.

Grado de Sensibilidad	Antibióticos									
	OXT		SX-TR		FFC		AOX		FQ	
	N	%	N	%	n	%	n	%	N	%
Sensible	17	100	17	100	17	100	13	72.3	17	100
Intermedia	0	0.0	0	0.0	1	5.6	0	0.0	0	0.0
Resistente	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	27.7	0	0.0

OXT, oxitetraciclina; SX-TR, sulfametoxasol - trimetoprim;  
FFC, florfenicol; AOX, ácido oxolínico; FQ, flumequina.

En la Tabla 6 se observa que para el ácido oxolínico de las 17 cepas, 13 cepas (72.3 %) fueron sensibles y 5 (27.7 %) fueron resistentes.

## 6. DISCUSION

Desde la aparición de *Yersinia ruckeri* en la industria salmonera chilena ha sido responsable de pérdidas, producto de mortalidades provocadas en salmón del atlántico (*S. salar*) estimadas en 8.400 toneladas por año (Bustos, 1993), además de utilización de vacunas, antibióticos y otros, que hacen necesaria la investigación y el constante monitoreo de esta bacteria para mejorar la prevención y el control de la enfermedad.

Originalmente, se presentó a *Yersinia ruckeri* como un organismo bastante homogéneo en las características serológicas, bioquímicas y morfológicas, sobre la base de aislados estudiados por Ross y Busch (citado por Inglis y col., 1993) correspondiendo al único serotipo descrito. Sin embargo, el estudio a través del tiempo y de diferentes áreas geográficas, ha podido constatar que el microorganismo es mucho más heterogéneo de lo que se había pensado (Stevenson y Daly., 1982).

En relación a los resultados expuestos en la Tabla 4, según las características bioquímicas descritas para *Y. ruckeri* (Wobeser, 1973; Ewing y col., 1978; O'Leary y col., 1979; Stevenson y Daly, 1982; Austin y Austin., 1989; Davies y Frerichs, 1989; Furones y col., 1993) se desprende que en las cepas analizadas, se presentan características bioquímicas similares al biotipo originalmente descrito y además, cepas que mostraron algunas características bioquímicas diferentes a lo esperado y comparado con la cepa patrón (ATCC 29473). Estas fueron ausencia de motilidad y no producción de hidrólisis de tween 80, las cuales fueron aisladas desde los lagos Llanquihue, Rupanco y desde el mar.

Estas cepas inmóviles e incapaces de hidrolizar el tween 80 ya habían sido descritas por Busch (1982), quien notó en su estudio que el 18% de las cepas eran inmóviles y el 14% no hidrolizaba el tween 80 pero no se percató que estas características estaban relacionadas. Davies y Frerichs (1989), luego de examinar 147 cepas de diferentes áreas geográficas, encontraron que todas las cepas inmóviles no hidrolizaron el tween 80 y viceversa, las cuales al realizarles análisis por microscopía electrónica, determinó que carecerían de flagelación peritrica. Este grupo claramente definido con aislados de Inglaterra y Noruega fue designado como *Y. ruckeri* biotipo 2, para diferenciarlo del biotipo originalmente descrito. En 1993, en Alemania se aisló una cepa desde Trucha arcoiris (*O. mykiss*) con estas características la cual se incubó a 17°C, 25°C, 30°C, 37°C y 42°C siendo inmóvil en todos los casos y no exhibiendo hidrólisis de tween 80 (Klein y col., 1994). Además, los peces no evidenciaron los síntomas clásicos de "Enfermedad Entérica de la Boca Roja", lo que también se



observó durante brotes ocurridos en el Reino Unido (Rodgers, 1991), situación que en el último tiempo también se ha observado en el medio nacional, presentándose sólo en algunos casos signos clínicos en los estados crónicos de la enfermedad, lo cual podría sugerir que esta cepa podría generar variación de la patogenia de la enfermedad, pero esto hasta la fecha no ha sido confirmado.

Según Davies (1990) aislados europeos de *Y. ruckeri*, son bioquímicamente indistinguibles de los aislados de Norte América, Australia y Sud África, a diferencia de los aislados ingleses y noruegos en donde además se presenta el biotipo 2.

Waltman y Shorts (1984), desarrollaron un medio selectivo que contiene tween 80, sucrosa y azul bromotimol para el aislamiento y diferenciación de colonias de *Y. ruckeri* las cuales aparecen verdes con una zona de hidrólisis de tween 80. Las experiencias con cepas aisladas de Inglaterra y Noruega han sugerido que este medio tiene limitación en el uso para su detección. Cepas provenientes de Inglaterra producen al medio débiles cambios de color y falta de hidrólisis de tween 80 (Furones, 1993). Esto podría indicar que este medio también sería insatisfactorio para la aislación y diferenciación de cepas nacionales con este tipo de características.

Otro hecho importante de destacar de la Tabla 4, es la positividad de dos cepas serotipo I a la fermentación del sorbitol. La fermentación del sorbitol es una de las pruebas mas notables desde que O'Leary en 1977 (citado por Dear, 1988) describiera la positividad de esta prueba como una característica propia del serotipo II, lo que se observa con la cepa serotipo II del estudio (cepa 18), y que permitiría diferenciarlo del serotipo original de Hagerman o I, el cual sería negativo. Sin embargo, Davies y Frerichs (1989) sostienen que ocasionalmente cepas pertenecientes al serotipo I pueden dar sobitol positivas. Incluso cepas serotipo III tanto de British Columbia como de Noruega fueron fermentadoras positivas, así como una cepa serotipo V de Colorado aislada desde trucha arcoiris (*O. mykiss*) ( Inglis y col., 1993; Furones y col., 1993). Por lo cual, se podría confirmar lo supuesto por Stevenson y Airdrie (1984) quienes sugieren que esta característica no es exclusiva del serotipo II.

Según Stevenson y Daly (1982), débiles reacciones a la fermentación del sorbitol podrían ser el resultado de medios de cultivo envejecidos. Alternativamente, se propone que la estructura química similar del sorbitol con el manitol, el cual es fermentado por todas las cepas de *Y. ruckeri*, podría permitir el transporte ilícito y la fermentación del sorbitol por las enzimas específicas para manitol, particularmente en altos niveles de sustrato, lo que podría explicar de otra forma los resultados positivos de sorbitol en el presente estudio.

Otras investigaciones indican que cepas que no fermentan el sorbitol son virulentas para peces y aquellas que la fermentan son avirulentas. Serotipo I sorbitol negativo causan más epizootias de ERM, aunque han ocurrido con cepas sorbitol positivas, concluyéndose que estas últimas son potencialmente virulentas (Furones y col., 1993).

En relación a lo mismo, falsas reacciones a la fermentación del sorbitol podrían presentar problemas diagnósticos al sugerir que las cepas positivas no están asociadas a la enfermedad y son de mucha menor virulencia.

Además de las pruebas antes mencionadas, pruebas que se presentaron variables dentro de las cepas nacionales y que no son propias de lo descrito para *Y. ruckeri* fueron producción de gas de glucosa y de hidrógeno sulfurado.

Diferentes temperaturas de incubación, pueden ser causa de variación en los resultados de estudios bioquímicos (Davies y Frerichs., 1989), por ejemplo, Inglis y col. (1993) sostienen que muchas cepas pueden producir gas en la fermentación de la glucosa, cuando son incubadas a 18°C, pero no lo producen o solo débilmente a 25°C. Esto podría explicar en parte la positividad de algunas cepas al ser incubadas a 22°C como la utilizada en este estudio.

Otros estudios que evalúan las características bioquímicas de *Y. ruckeri* se han efectuado con sistemas API-20E como método de diagnóstico de rutina. Romalde y Toranzo (1991) constataron que a través de este sistema se obtienen reacciones falsas negativas y positivas. Las reacciones falsas negativas se relacionan con voges-proskauer, tests de citrato y gelatina; por otra parte, las reacciones falsas positivas fueron usina decarboxilasa, fermentación de sorbitol e inositol. Además, ellos sostienen que para *Y. ruckeri* el sistema API-20E no tiene todos los códigos en su base de datos y que en muchos casos esto lleva a interpretar los resultados como otros microorganismos, especialmente la enterobacteria *Hafnia alvei*, lo cual podría ser de interferencia diagnóstica.

Sin embargo, variaciones en tests bioquímicos en RM, VP, motilidad a 25°C, liquefacción de la gelatina y fermentación del sorbitol y arabinosa han sido reportadas previamente. (Stevenson y Daly, 1982).

En relación con la prueba de producción de hidrogeno sulfurado, esta fue positiva para la mayoría de las cepas incluyendo la cepa patrón, a pesar que se describe negativa para *Y. ruckeri* cuando es medida en TS1 (Triple Sugar Iron agar). En el presente estudio, la positividad de esta prueba se explica por la utilización de tiras de acetato de plomo para medir la producción de hidrogeno sulfurado, que según O'Leary

y col. (1979), es de mayor sensibilidad que TST, situación también descrita por Busch, (1973) quien obtuvo reacciones positivas en todos sus aislados usando un medio con acetato de plomo.

En este estudio, todas las cepas fueron rojo-metilo y voges-proskauer positivas. Según Davies y Frerichs (1989), no existe una clara correlación que podría ser demostrada entre cepas variables en RJV1 y VP, pero de hecho VP+/RM+, VP+/RM- y VP-/RM+ han sido todas identificadas. Los autores describen que esta asociación indicaría la presencia de una vía metabólica ácido fermentadora mezclada con la formación de acetoína y 2,3 butanediol por este tipo de cepas, sugiriendo que en un análisis de producto final pueden ser usados en un estudio taxonómico y epidemiológico de *Y. ruckeri*.

En la Tabla 4, al comparar la cepa patrón serotipo I con la cepa serotipo II se observa que esta última varió fermentando el sorbitol y no produciendo hidrógeno sulfurado, lo cual concuerda con lo reportado por la literatura donde se cita la fermentación del sorbitol como la única diferencia bioquímica entre los serotipos mencionados (Stevenson y Daly, 1982).

En las fotos 1 y 2 se observa la electroforesis de los componentes proteicos de las cepas nacionales de *Y. ruckeri*, donde se obtuvieron 12 bandas diferentes con pesos moleculares que van de 18 kDa a 97 kDa. En un estudio realizado por Vallejos (1994), el análisis de los componentes proteicos de una cepa de *Y. ruckeri* mediante electroforesis describe que las bandas más características encontradas están entre los pesos moleculares de 25 kDa a 100 kDa, lo cual es similar a lo observado en el presente trabajo.

Dentro de los aislados nacionales fue posible describir 3 grupos electroforéticos basándose en patrones proteicos similares (Fig. 2 y 3). Con una primera agrupación compuesta por cepas que mostraron entre 8 y 9 bandas con pesos moleculares de 18, 20, 26, 29, 40, 58, 60, 63 y 97 kDa, un segundo grupo, el cual posee 4 y 5 bandas con pesos de 26, 33, 37 40 y 50 kDa y finalmente un tercer grupo con 4 bandas con pesos de 26, 33, 37 y 40 kDa. En relación a estos grupos electroforéticos, no se estableció una asociación entre estos y cepas móviles o inmóviles, cepas resistentes a antibiótico o cepas de diferente variedad serológica. Presentándose cepas móviles e inmóviles en las tres agrupaciones antes mencionadas, cepas resistentes a ácido oxolínico en los grupos 1 y 2 y además se puede observar que las bandas de la cepa serotipo 11 es similar a las bandas del grupo 1, constituido además por cepas del serotipo I.

Por su parte, la cepa patrón utilizada, mostró un perfil proteico con 5 bandas con pesos de 26, 29, 31, 34 y 40 kDa, coincidiendo con la totalidad de las cepas en estudio en dos bandas, una de 26 kDa y otra de 40 kDa.

En la Tabla 5 se determinó la susceptibilidad cualitativa que presentaron las bacterias a oxitetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, florfenicol, ácido oxolínico y flumequina. La respuesta observada dio sensibilidad para todas las cepas a oxitetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim y flumequina. En el caso del florfenicol una cepa presentó sensibilidad intermedia y para el ácido oxolínico, se presentaron 5 cepas resistentes, tanto del lago Llanquihue como Rupanco, visualizándose este tipo de cepas desde el año 1994. Cabe destacar, que 4 de estas cepas fueron inmóviles y una móvil. La percepción del medio nacional ha sido asociar cepas ácido oxolínico resistentes e inmóviles, sin embargo, en este estudio podemos observar que esto no ocurre siempre y que la resistencia a este antibiótico puede ocurrir en cepas móviles.

Como se observa en la Tabla 6, ácido oxolínico resultó ser el antibiótico con menor sensibilidad, con un 72.3 % (12 de 17 cepas) sensibles. Además actualmente se postula que los halos de inhibición de 11 mm que determina resistencia no son el reflejo de la realidad de su efecto sobre brotes en terreno (Whitman y McNair, 1996). Postulándose que los halos de inhibición para patógenos de peces en sensibilizadores de 2 µg para el ácido oxolínico, debería ser menor de 14 mm para cepas resistentes, entre 14 -18 mm para mediana sensibilidad y mayor de 18 mm para sensibilidad. De esta manera los resultados del presente trabajo se modificarían en que, solo el 53 % (9 de 17 cepas) serían sensibles. Por ende, es primordial establecer cuales son los halos de inhibición adecuados para las cepas nacionales ya que de esto dependerá el éxito o fracaso de un tratamiento.

En la Tabla 6 también se aprecia que para el caso de la cepa serotipo II, esta fue sensible a la totalidad de los antibióticos utilizados. En relación a las diferentes variedades serológicas, según un estudio realizado por De Grandis y Stevenson (1985), no hubo diferencias significativamente en sus respuestas a la mayoría de los agentes antimicrobianos, con la excepción de la polimixina B en donde las cepas serotipo II, III y V fueron altamente resistentes, mientras que la mayoría de las cepas serotipo I fueron sensibles. Estos autores indican que los mismos antibióticos pueden ser usados en el tratamiento de brotes de Yersiniosis en cultivos intensivos de salmónidos sin detenerse en la determinación de la variabilidad serológica involucrada.

Por otra parte, se ha observado que los patrones de susceptibilidad de *Y. ruckeri* se han ido modificando significativamente dentro del ecosistema acuícola a medida que progresa el tiempo, hecho dado seguramente por el uso y/o abuso de fármacos antimicrobianos en la terapia de esta y otras patologías.

En este mismo sentido, hasta el día de hoy no existe en Chile conciencia ni conocimiento claro de los efectos de los residuos generados por los cultivos de salmonídeos y las afirmaciones de personeros del área en el sentido de que "no se está contaminando el agua, ya que la necesitamos limpia", han resultado poco convincentes debido a la ausencia de un programa masivo de monitoreo e investigación (Caro, 1995).

Además, otros problemas que puede ocasionar el uso intensivo de antibióticos es que, bacterias las cuales son patógenas para humanos pueden estar naturalmente en criaderos de peces o en el medio ambiente acuático y como los peces son usados para el consumo humano, el desarrollo de resistencia a estos patógenos podría poner en riesgo la salud del consumidor (Spanggaard y col., 1993). Incluso se ha reportado un aislamiento de *Y. ruckeri* desde bilis de un paciente humano, sin determinarse la significancia clínica de dicho hallazgo (Rodgers, 1991).

Se ha puesto en marcha el sistema de Control de Residuos de Productos Farmacéuticos por parte de Serna pesca, que se debe a disposiciones de E.E.U.U. y la comunidad europea, mercados que exigen a partir de este año que los productos provenientes de la acuicultura sean elaborados en plantas de proceso que tengan Programas de Aseguramiento de Calidad (PAC) donde se analizan muestras de producto frente a determinados antibióticos, permitiendo realizar una mejor vigilancia sobre este tipo de fármacos (Rusque, 1998).

Es relevante analizar comparativamente el uso de antibióticos en las industrias salmoneras de Noruega y Chile, que ocupan el primer y segundo lugar en producción mundial respectivamente. En el primero de ellos el gobierno posee el monopolio de la venta de estos productos, registrándose minuciosamente los casos de enfermedad en los peces, los productos utilizados y cantidad empleada. En Chile no existen datos oficiales referidos al uso de antibióticos, siendo la única información disponible una estimación realizada por veterinarios, que para el año 1993 determinó el uso de 90 toneladas de principio activo. Al comparar con los Noruegos, se advierte que para producir la misma cantidad de salmón, Chile ocupa un volumen de antibióticos 75 veces superior, lo cual aunque adolezca de cierto margen de error gráfica las condiciones en las que se ha desarrollado la actividad productiva chilena (Caro, 1995).

Los antibióticos más utilizados son flumequina, ácido oxolínico y sulfatrimetoprim. Últimamente se ha introducido el florfenicol sin alcanzar aún el nivel de uso que han obtenido los fármacos anteriormente mencionados (San Martín, 1996).

En la Tabla 6, se aprecia que en las cepas en estudio no se detectó multiresistencia con los antibióticos analizados, a pesar que en terreno se ha

determinado escaso éxito a terapias con oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, sarafloxacino y enrofloxacino, situación altamente riesgosa puesto que sugiere el desarrollo de mecanismos de resistencia en muy poco tiempo, dado que los dos últimos fármacos se han incorporado hace muy poco tiempo como quimioterápicos en la salmonicultura nacional, no obstante que la sensibilidad frente a sulfametoxasol-trimetoprim ha permanecido invariable (Enriquez, 1997\*<sup>3</sup>).

En la actualidad, a pesar de que ocurren brotes por *Y. ruckeri* con diferentes patrones de susceptibilidad, indistintamente la utilización de una droga específica contra el tipo presente, selecciona a resistentes preexistentes y esto genera nuevos brotes posteriormente tornándose el control extremadamente dificultoso. Esta dinámica microbiana, puede ser la responsable de la aparición en terreno, de resistencia a ácido oxolínico por medio de mutación cromosómica, ya que resistencia codificada por plasmidos para este antibiótico nunca ha sido detectada (Spanggaard y col., 1993) y esto crea sin duda un desafío en la implementación de estrictas normas de manejo para evitar factores de disposición en el huésped y monitorear las condiciones medio ambientales a fin de que la Yersiniosis no se transforme en un problema aún más serio.

Bustos (1998) en este sentido menciona que dentro de las prácticas de manejo necesarias es el contar con un sistema de producción "all in-all out", minimizar el estrés en los peces, hacer descansar los sitios de cultivos, realizar rotación de especies, controlar y utilizar densidades apropiadas, controlar la extracción y disposición de las mortalidades y realizar un desglose de mortalidades según causa, lo cual favorecerá el control de esta y otras patologías.

Algunos patógenos son capaces de sobrevivir en el sedimento largos periodos de tiempo, así como residuos de drogas, lo que puede llevar a producir: un cambio cualitativo y cuantitativo de la flora bacteriana en el sedimento, causando alteraciones en la velocidad de degradación de la materia orgánica, efecto tóxico en la fauna silvestre y desarrollo de resistencia bacteriana (Nygaard y col., 1992).

*Y. ruckeri* no es capaz de sobrevivir libremente por extensos períodos en la columna de agua, sin embargo puede sobrevivir alrededor de dos meses en el sedimento (Austin y Austin, 1989). Por otra parte, antibióticos como ácido oxolínico, oxitetraciclina y otros permanecen en el sedimento por largos períodos de tiempo potencialmente activos, por ejemplo, oxitetraciclina se ha encontrado en concentraciones capaces de causar efectos antimicrobianos hasta 12 semanas después que ha sido utilizada. Esto podría ser otra explicación del desarrollo de resistencia de

---

<sup>3</sup> Comunicación personal. Dr. Ricardo Enriquez.  
Ictiopatología. Universidad Austral de Chile.

esta bacteria en terreno (Grare y col., 1990; Nygaard y col., 1992).

La mayor causa de resistencia bacteriana en acuicultura son los plásmidos, los cuales actúan en casos de trimetoprim, sulfas y tetraciclinas (Lewin, 1992). Según un estudio realizado por De Grandis y Stevenson (1985) donde se examinó el efecto de 23 agentes antimicrobianos sobre 50 cepas de *Y. ruckeri*, se obtuvieron 2 cepas altamente resistentes tanto a tetraciclina como a sulfamidas, demostrándose la presencia de determinantes de resistencia para ambos antibióticos portados en plásmidos de 36 MDa. Se conoce que los plásmidos de *Y. ruckeri* son completamente diferentes a los plásmidos de los otros miembros del género *Yersinia*. La mayoría de los serotipo I testeados por estos autores, portaban plásmidos de 40-50 MDa, aunque otros trabajos varían entre 40 y 78 MDa, al parecer las discrepancias en el tamaño se debería a los diferentes aislados de ADN y a los métodos de purificación empleados (Furones y col., 1993)

Es difícil relacionar la susceptibilidad in Vitro de las bacterias a los agentes antimicrobianos, con la eficiencia in vivo de los fármacos en los tratamientos. Sin embargo, la MIC (cantidad mínima inhibitoria) determinada por ensayos in Vitro es eficiente en algunos casos en la identificación del agente antimicrobiano que puede ser apropiado in vivo en los peces afectados por Yersiniosis, especialmente ácido oxolínico y sulfamidas potenciadas (Bullock y col., 1983; De Grandis y Stevenson, 1985). Por los grados de resistencia que mostraron las cepas a ácido oxolínico (Tabla 7) en este estudio, deberían realizarse antibiogramas y determinación de la MIC, como herramientas para determinar la utilización o no del mencionado antibiótico en terreno en un futuro próximo.

En relación con los antecedentes y resultados anteriormente expuestos se concluye:

- ◆ En los ecosistemas acuáticos anteriormente mencionados, coexisten cepas de *Yersinia ruckeri* bioquímicamente similares al biotipo originalmente descrito (serotipo I), así como cepas que presentan características bioquímicamente distintas con relación a la motilidad e hidrólisis de tween 80, grupo claramente definido dentro de los aislados nacionales.

- ◆ La fermentación del sorbitol, fue positiva tanto para cepas serotipo I como II.
- ◆ A través de electroforesis de los componentes proteicos de *Yersinia ruckeri*, no fue posible asociar grupos electroforéticos con cepas móviles o inmóviles, cepas resistentes a antimicrobianos o cepas de diferente variedad serológica.
- ◆ La resistencia encontrada a ácido oxolínico, nos lleva a evaluar su utilización contra Yersiniosis y otras patologías en el futuro.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- ALVARADO, V.** 1990. Producción y patología de peces; enfermedades bacterianas, vírales y parasitarias. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Ictiopatología. pp 47.
- AMEND, D. F., K.A. JOHNSON., T. R. CROY y D. H. McCARTHY.** 1983. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins. *Journal of Fiseases*. 6: 337-344.
- AUSTIN, B. y D. A. AUSTIN.** 1989. *Yersinia ruckeri*. In Bacterial Fish Pathogens: disease in farmed and wild fish. John Wiley and Sons, New York, pp 207-224.
- AUSTIN, B., M. CREEN y C.J. RODGERS.** 1982. Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*. 27: 73 - 78.
- BERGEY' S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY.** 1986 Williams and Wilkins. Baltimore/London. pp. 408-420.
- BARJA, J. L. y A.E. TORANZO.** 1988. Infecciones causadas por Enterobacterias. Patología en Acuicultura. CAICYT. Madrid, España, pp 501-505.
- BRADFORD, M. M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principie of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.
- BRAVO, S.** 1993. Diseases Reported in Pen Reared Salmonids from Chile. *FHS/AFS Newsletter*. 21(3): 3.
- BULLOCK, G. L., G. MAESTRONE, C. STARLIPER y B. SCHILL.** 1983 Potentiated sulfonamide therapy of enteric redmouth disease. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 101-102.
- BULLOCK, G. L. y S. F. SNIESZKO.** 1979. Enteric redmouth disease of salmonids. Dept. Interior, USFWS, FLD-57 pp7.

- BULLOCK, G. L., H. M. STUCKEY y E. B. SHOTTS.** 1978 Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic Areas. *Journal of Fish Diseases*. 1: 351-356.
- BUSCH, R. A.** 1973. The serological surveillance of salmonid populations for presumptive evidence of specific disease association. Ph. D. Thesis, Univ. of Idaho, Moscow, Idaho. pp 106.
- BUSCH, R. A.** 1982. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In Antigenes of Fish Pathogens. Symposium Internacional de Talloires. Ed by D. P. Anderson, M. Dorson y Ph. Dubourget, Marcel Merieux, Lyon. pp 201 - 223.
- BUSCH, R. y A. J. LINGG.** 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of E.R.M.D. in rainbow trout (*S. gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* 32 (12): 2429-2432.
- BUSTOS, P.** 1993. Pérdidas por enfermedades bacterianas de salmónidos en Chile. *Aquanoticias Internacional*. 19: 4 - 1
- BUSTOS, P.** 1996. Manejos sanitarios en la salmonicultura. *Aquanoticias Internacional*. 31: 41 -47.
- BUSTOS, P.** 1998. Control de enfermedades es clave para consolidar la salmonicultura. *Aquanoticias Internacional*. 40: 62-65.
- CAMPOS, M.** 1995. Producción de salmónidos en 1994: ¡ Record histórico !. *Aquanoticias Internacional*. 26: 7 - 11.
- CARO, H.** 1995. Problemas de relevancia en la interacción de la acuicultura con el medio ambiente. 5° Encuentro nacional sobre el medio ambiente. CIPMA. U. de la Frontera. Temuco.
- DALY, J. G., B. LINDVIK y R. M. W. STEVENSON.** 1986. Serological heterogeneity of recent 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.

- DAVIES, R L. y G. N. FRERICHS.** 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J. Fish Dis.* 12:357-365.
- DEAR, G.** 1988. *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic Salmon in Scotland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 8(2): 18-20.
- DE GRANDIS, S. A. y R M. W. STEVENSON.** 1985. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of fish pathogen ***Yersinia ruckeri***. *Antimicrobial. Agents Chemotherapy.* 27(6): 938-942.
- 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 FANNEVG.** 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *Int. J. of Syst. Bact.* 28(1): 37-44.
- FRERICHS, G. N., J. A. STEWART y R. O. COLLENS.** 1985 Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases.* 8: 383-387.
- FURONES, M. D., C. J. RODGERS y C. B. MUNN.** 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Rev. of Fish Diseases.* pp 105 - 129.
- GRAVE, K., M. ENGELSTAD, N. E. SOLÍ y T. HASTEIN** 1990 Utilization of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during 1980-1988. *Aquaculture.* 86: 347-358.
- INFANTE, R.** 1996. *Salmonoticias.* 52: 2.
- INGLIS, V., R J. ROBERTS y N. R BROMAGE.** 1993. Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections of fish. *In Bacterial Diseases of Fish.* pp 80 - 105.
- JARPA, M.** 1990. Aquaveterinaria. *Aquanoticias Internacional.* 5: 53.
- JOHNSON, A.** 1989. Aquaveterinaria. *Aquanoticias Internacional.* 3: 57.

- KLEEV, B.U., D. W. KLEINGELD y K. H. BÖHM.** 1994 First isolation of a non-motile/tween 80 negative *Yersinia ruckeri* strain in Germany. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14(5): 165-166.
- LAEMMLI, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-687.
- LEWIN, C.** 1992. Mechanisms of resistance developed in aquatic microorganisms. EN: Chemotherapy in aquaculture: From theory to reality. Symposium. Paris, France. pp 280-301.
- Mc DANIEL, D. W.** 1971. Hagerman red mouth, a new look at an old fish problem. *Amer. Fishes and U. Strout Neww.* 15(5): 14-28.
- Mc DANIEL, D. (ed).** 1979. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. *Amer. Fish. Soc., Meth. Sec.* pp.55-57.
- MENDEZ, R. Y C. MUNITA.** 1989. La salmonicultura en Chile. Ed. Ricardo Cortés. Santiago, Chile, pp. 229.
- NOGA, E. J., J. F. LEVINE., K. TOWNSEND., R. A. BULLÍS., C. P. CARLSON y W. T. CORBETT.** 1988. Kidney biopsy: A nonlethal method for diagnosis of *Yersinia ruckeri* infection (Enteric Redmouth Disease) in rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Am. J. Vet. Res.* 49: 363-365.
- NYGAARD, K., LUNESTAD, B. T., HEKTOEN, H., BERGE, J.A. y HORMAZABAL, V.** 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture.* 104: 31-36.
- O'LEARY, P. J., J. S. ROHOVEC y J. L. FRYER.** 1979. A further characterization of *Yersinia ruckeri* (enteric redmouth bacterium). *Fish Pathology.* 14(2): 71-78.
- OÑATE, A. y H. FOLCH.** 1989. Proteínas totales de *Brucella abortus* cepa 19 y sus contaminantes. *Arch. Med. Vet., XXI, N° 2,* pp: 103-108.
- OTTH, L.** 1990. Test de susceptibilidad a los antibióticos. EN: Diagnóstico Microbiológico. Instituto de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. pp. 57-75.

- RODGERS, C. J.** 1991. The Control of enteric redmouth disease in Fish. *Trouts News* 12:27-30.
- ROMALDE, J. L. y A. E. TORANZO.** 1991. Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull Eur. Ass. Fish Pathol.* 11(4): 147-149.
- RUSQUE, J.** 1998. En vigencia control de residuos farmacéuticos. *Aquanoticias Internacional.* 40: 57-59.
- SAN MARTIN, B.** 1996. Conceptos generales en la selección de un antibiótico o sulfa en la terapia de salmónidos. *Revista de extensión Tecno Vet.* 2: 27-30.
- SHOTTS, E. B. y T. G. NEMETZ.** 1993. Selected bacterial disease of salmonis. EN: STOSKOPF, M. K: 1993. *Fish Medicine.* 2nd., W. B. Saunders. Philadelphia.
- SOLERVICENS, R.** 1995. Allin Allout: Aprendiendo de la experiencia de otros. *Aquanoticias Internacional.* 26: 57.
- SPANGGAARD, B., F. JORGENSEN., L. GRAM, y H. HUSS** 1993 Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in *Denmark.* *Aquaculture.* 115: 195-207.
- STEVENSON, R. M. W y D. W. AIRDRIE.** 1984. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *Journal of Fish Diseases.* 7: 247-254.
- STEVENSON, R. M. W. y J. G. DALY.** 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri.* *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 870-876.
- TABATABAI, L. B., B. L. DEYOE y A. E. RITCHE.** 1979 Isolation and characterization of toxic fractions from *Brucella abortus.* *Infec. Immun.* 6: 668-679.
- VALLE JOS, J. I.** 1994. Preparación de un antígeno soluble de *Yersinia ruckeri*, obtención de anticuerpos y su utilización en técnicas diagnósticas. Tesis de Licenciatura en Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia, Chile.
- VIDAL, L.** 1998. Estadísticas. *Aquanoticias Internacional.* 40: 90-91.

- WALTMAN, W.D. y E.B. SHOTTS.** 1984. A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 41: 804-806.
- WHITMAN, A., y N. MACNAIR.** 1996: Finfish and shellfish bacteriology manual. 1<sup>a</sup> de. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island. Canadá.
- WOBESER, G.** 1973. An Outbreak of redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. *J. Fish Res. Bd. Can.* 30: 571-575.

## **8. ANEXOS**

**8.1 Identificación de las cepas, según número asignado en el estudio y clave del laboratorio.**

<b>Número de cepa</b>	<b>Clave laboratorio</b>
1	B 83/93
2	B 05/94
3	B 85/95
4	B 70/94
5	B 95/95
6	cepa. Cholgo
7	B 59/94
8	B 107/95
9	B 27/96
10	B 88/95
11	B 90/95
12	B 67/94
13	B 33/95
14	B 29/96
15	B 86/95
16	B 30/95
17	ATCC (29473)
18	Serotipo II

**8.2 Soluciones para electroforesis en geles de poliacrilamida -SDS.**

**1. Solución tampón gel espaciador (pH 6.8)**

Tris	0,495 M
HCL	0,480 M
H2O c.s.p.	100%
Es mantenida a 4°C.	



## 2. Solución tampón gel separador

Acril: bisacril (30:0,8)	5 %
Tris-HCL (pH 8,8)	0,909 M
SDS	0,3 %
Persulfato de Amonio	0,125 %
TEMED	0,033 %
H <sub>2</sub> O c.p.s.	100%

## 3. Solución tampón de corrida (pH 8.3)

Tris	0,025 M
Glicina	0,192M
SDS	0,1 %

Esta solución esta preparada al 5x, al momento de usar se diluye 1: 4 con agua destilada, es mantenida a 4°C.

## 4. Solución tampón muestra

SDS	5 %
Glicerol	25 %
Azul de brom.	0,05 %
Tris-HCL c.s.p.	0,125M

## 5. Solución de teñido

Azul de Coomasie G	0,3 %
Metanol	50,0 %
Ac. Acético	10,0%^
H <sub>2</sub> O dest. c.s.p.	100,0%

**Página no disponible en original**

## **AGRADECIMIENTOS**

Es mi intención agradecer a todos los que participaron en la ejecución de este estudio, especialmente al Dr. Ricardo Enríquez, profesor patrocinante por sus consejos y buena disposición en la realización del presente trabajo.

Además, quiero agradecer al Dr. Hugo Folch, Dr. Carlos Parías, T.M. Mónica Monrás, Sra. Mónica González y Sr. Esteban Henríquez.