



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

Determinación experimental de la vía de contagio del agente U2 (RLO)
aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) en Salmón del Atlántico
(*Salmo salar*)

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

Marcelo Alfonso Brossard Andrade

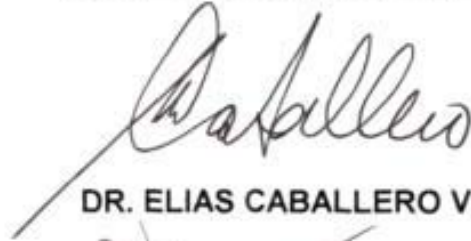
Valdivia Chile 1999

PROFESOR PATROCINANTE :



DR. RICARDO ENRIQUEZ S.

PROFESORES CALIFICADORES :



DR. ELIAS CABALLERO V.



DR. GASTON VALENZUELA J.

FECHA DE APROBACION :

02 DE DICIEMBRE DE 1999

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODO	7
RESULTADOS	10
DISCUSION	16
CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFIA	20
ANEXOS	22

1.RESUMEN

Determinación experimental de la vía de contagio del agente U2 (RLO) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

Con el objetivo de aportar antecedentes a las vías de contagio de U2 (RLO : Organismo semejante a Rickettsia), se inocularon Salmones del Atlántico (*Salmo salar*) con un aislado de U2 de Puye (*Galaxias maculatus*) capturado en el lago Llanquihue.

El material de la investigación estuvo constituido por 135 Salmones del Atlántico (18 +/- 3 gr), distribuidos equitativamente en 5 acuarios con capacidad para 90 litros de agua, mantenidos en el laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

La totalidad de los peces fueron inoculados simultáneamente, utilizando una concentración de 10^5 TCID₅₀ /ml de U2 mediante diferentes vías: intraperitoneal (0,15 ml/pez), intramuscular (0,15 ml/pez), oral (0,15 ml/pez) y mediante baño, además de un grupo control inoculado i.p con medio de cultivo de células no infectado.

Todos los peces inoculados vía i.p. e i.m. murieron, comprobándose que el microorganismo en estudio causó enfermedad con mortalidad asociada. En el grupo inoculado vía oral no se produjo mortalidad. Estos peces fueron sacrificados el último día del ensayo y en ninguno de ellos fue posible detectar el agente. En los peces tratados mediante baño no fue posible observar el microorganismo. Se debe aclarar que la totalidad de este grupo murió el día 19 p.i., debido a estrés derivado de uno de los cambios de agua.

La signología clínica permitió caracterizar la enfermedad como una septicemia hemorrágica bacteriana. Microscópicamente U2 se observó como un organismo gram negativo de forma esférica o cocoide, frecuentemente pleomórfico en cúmulos intra y extracelulares. La confirmación del agente inoculado se realizó mediante tinción de gram, inmunofluorescencia indirecta, microscopía electrónica; además, la tinción giemsa de los frotis de sangre, reveló presencia de cúmulos cocoides en el citoplasma de macrófagos, lo que demuestra el carácter septicémico de la enfermedad.

Los resultados permiten concluir que U2 (RLO) aislado de Puye (*G. maculatus*) es patógeno para Salmón del Atlántico, lo que implica que el Puye podría ser un reservorio del agente en la naturaleza.

Palabras claves: RLO-U2, *G. maculatus*, *S. salar*.

2. SUMMARY

Experimental determination of the invasion mechanism of (RLO) U2 agent (Rickettsia like organism) isolated from Puye (*Galaxias maculatus*) in *Salmo salar*.

For the purpose of contributing to events of horizontal transmission of (RLO) U2, Atlantic salmon (*Salmo salar*) were injected with an isolated U2, from Puye (*G. maculatus*), captured in Llanquihue lake.

The material for this investigation was constituted of 135 Atlantic salmon (18 +/- 3 g), distributed equally 5 aquariums with 70 lts of fresh water and maintained in the Ictiopalologia labs at the Universidad Austral de Chile.

All fishes were inoculated with 0,15 ml/fishes of a bacterial preparation at 10^5 TCID₅₀/ml of U2 the challenge dose via: ip, im, oral and bath administration.

All fishes from the group challenged via ip and im died. This confirms that the inoculated organism had an associated mortality. In the group challenged via oral, there was no mortality during the experimental period. These fish were sacrificed the last day of the assay none of the fishes from this group showed any evidence of U2. While fishes challenged by bath treatment showed no mortality and no U2 organism. However, it has to be said that all fishes in this group died at 19 days post inoculation to stress induced by one of the water changes.

Clinically, the disease was characterized by a bacterial haemorrhagic septicemia. At the light microscopy U2 organism was observed as spherical or coccoid gram negative bacteria, frequently found as a pleomorphic organism located intra and extracellular as aggregates of cells.

The confirmation of the infectious agent was done by gram stain, indirect immunofluorescence, electron microscopy. Besides, Giemsa stain of blood smears showed the presence of aggregates of coccoid (RLO) in the cytoplasm of macrophages like cells indicating the septicemic nature of the disease.

The results allow us to suggest that the (RLO) U2 isolated from Puye (*G. maculatus*) is pathogenic for *S. salar*. And that Puye could be the reservoir of this pathogen in nature.

Key words: RLO-U2, *G. maculatus*, *S. salar*

3. INTRODUCCION

Las exportaciones de productos de la acuicultura nacional durante 1998 sumaron 188 mil toneladas y los retornos fueron cercanos a los US\$775 millones. Así, Chile se mantiene como el segundo país productor de salmón en confinamiento. El gran desarrollo que ha experimentado la salmonicultura nacional, especialmente en la zona sur de nuestro país, la ha convertido en una de las actividades de mayor productividad, con un crecimiento del orden del 14,7% en relación al año anterior (Aquanoticias, 1999).

Las excelentes condiciones hidrológicas de nuestro sistema acuático, los costos de producción relativamente menores y la captación del mercado internacional, han sido las ventajas principales que han impulsado éste crecimiento (Méndez y Vidal, 1994).

En Chile, durante la temporada 1991-1992 la mortalidad promedio nacional entre la etapa de incubación a la de 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 éste porcentaje aumentará a un 45%, básicamente por el impacto de la Yersiniosis y la creciente severidad del Síndrome Rickettsial Salmonídeo.

Méndez y Vidal (1994) señalan la necesidad de efectuar acciones prontas y efectivas para contrarrestar las pérdidas debido a los agentes bacterianos. Su éxito se verá reflejado en una disminución de costos y un aumento de la producción. Según estos mismos autores, Noruega ha dado muestras indesmentibles de esta afirmación, al reducir sus costos de producción en más de un 30% debido al control de enfermedades.

Las enfermedades que provocan las mayores pérdidas en Chile, son la Septicemia Rickettsial Salmonídea, la Flavobacteriosis y la Necrosis Pancreática Infecciosa (R. Enriquez, 1998, Comunicación personal).

LA SEPTICEMIA RICKETTSIAL SALMONIDEA (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 y proliferativa del riñón y bazo, con necrosis focales del tejido hepático y hemorragias de las fibras musculares (Alvarado y col., 1990).

La infección rickettsial en peces salmonídeos fue considerada de importancia económica desde que un masivo brote fue reportado en 1989. La nueva enfermedad, de etiología desconocida, causó la muerte de aproximadamente 1,5 millones de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) de tamaño de mercado, cultivado en el área de Calbuco, sur de Chile (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich y col., 1990; Fryer y col., 1990). La enfermedad fue después descrita afectando al salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Cvitanich y col., 1991).

El organismo causante de este brote en Chile fue identificado como *Piscirickettsia salmonis*, organismo rickettsial perteneciente al orden Rickettsiales, familia Rickettsiaceae, tribu Ehrlichieae (Fryer y col., 1992). Debido al carácter sistémico de la enfermedad se propuso el nombre de "Septicemia Rickettsial Salmonídea, SRS" (Cvitanich y col., 1991). Actualmente, ésta enfermedad también conocida como "Piscirickettsiosis" es la condición infecto contagiosa más importante que afecta a la industria del salmón chilena (Almendras y col., 1997).

P. salmonis es un microorganismo intracelular obligado, gram negativo, esférico o cocoide, frecuentemente pleomórfico, inmóvil, no encapsulado, de tamaño entre 0.5 -1.8 μm (Cvitanich y col., 1991).

Inicialmente SRS fue solamente descrita en agua salada (Bravo y Campos, 1989; Fryer y col., 1992), posteriormente brotes naturales de SRS fueron reportados en trucha arcoiris y salmón coho cultivados en lago (Bravo, 1994; Gaggero y col., 1995). Las lesiones observadas en peces afectados y las características del crecimiento in vitro del aislado fueron similares a las observadas previamente en brotes de agua salada (Gaggero y col., 1995).

Los principales signos clínicos y lesiones de SRS descritas tanto para infección natural como experimental incluyen letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel del dorso, dificultad respiratoria y natación en la superficie (Branson y Nieto, 1991; Cvitanich y col., 1991). Las lesiones en la piel incluyen hemorragia perianal y petequias en el abdomen. Hemorragias superficiales y úlceras de variado tamaño 0.5 - 2.0 cm de diámetro y nódulos blancos sólidos de diámetro mayor a 1 cm también ha sido descrita exoftalmia bilateral, estomatitis ulcerativa y equimosis periocular (Branson y Nieto, 1991).

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 ; 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) y Gaggero y col. (1995) la indican como una de las posibles causas de los brotes de SRS 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; Cubillos y col., 1990; Schäfer y col., 1990).

En los meses de diciembre de 1994 y enero de 1995, se aisló un nuevo organismo semejante a Rickettsia (RLO= Rickettsia like organism) 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 (Unidentified agent = Agente no identificado 2), posteriormente se le denominó U2, como una forma de denominación más corta (Cvitanich y col., 1995). Adicionalmente en 1997 se aisló otro (RLO) desde Puyes (*G. maculatus*) capturados en el lago Llanquihue, alcanzando mortalidades acumuladas de un 87 % en un período de 10 meses (Enríquez y col., 1998). La lesión en el Puye y las características de este agente aislado son similares a las descritas en Salmones del Atlántico por Cvitanich y col. (1995).

Las mortalidades observadas en cuadros causados por U2 en Salmón del Atlántico se presentan a temperaturas que fluctúan entre 9 y 17 °C, siendo estas del orden de 4 a 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 predilección por el tejido 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).

Los Salmones del Atlántico 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 con hematocritos menores a 20 % (Cvitanich y col., 1995). De acuerdo a estos mismos autores, 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.

Las características del agente U2 aislado de Salmón del Atlántico y de las rickettsias, son su capacidad de crecer solo en células vivas de huéspedes infectados y no en medios de cultivo bacteriológicos. A la fecha, U2 ha logrado ser cultivado en 7 líneas celulares de peces a saber: (EPC, CHH-1, CHSE 214, RTG 2, FHM, BB Y BF-2). A temperaturas de 15 a 17 °C U2 produce efecto citopático detectable a los dos días en línea celular 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 0,1 - 0,8 μm 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 clasificación definitiva.

La presente investigación tiene por objeto, determinar la principal vía de contagio de U2 (RLO : Organismo semejante a Rickettsia) en Salmones del Atlántico (**S. salar**), utilizando un aislado de Puye.

El determinar la principal y/o vías de contagio de U2, permitirá establecer las similitudes y diferencias en relación con SRS y otras patologías. De igual forma, se podrán tomar medidas profilácticas, que permitan un adecuado control de la enfermedad y contribuir a la epidemiología de esta condición.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 MATERIAL

El material de la investigación estuvo constituido por 135 Salmones del Atlántico (*Salmo salar*), con un peso promedio de 18 g +/- 0.5 g, los peces fueron transportados desde una piscicultura ubicada en la X Región y fueron mantenidos en acuarios con agua recirculante a temperatura promedio de 12 °C. Además entre ellos un grupo control de 27 Salmones del Atlántico, mantenidos en el laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

Los peces se distribuyeron en 5 acuarios con agua dulce recirculante en un volumen de 70 litros cada uno, con aireación constante y a una temperatura promedio de 12 °C. La alimentación de los peces consistió en una dieta seca comercial en cantidad equivalente al 2 % de su peso corporal por día.

El agua se obtenía una vez por semana del estero Piedras Blancas, Provincia de Valdivia.

4.1.1 Materiales sala de acuarios

- a.- 5 acuarios de fibra de vidrio con una capacidad de 90 litros
- b.- 5 filtros de carbón activado
- c.- 5 difusores de aire
- d.-1 tubo de oxígeno con una capacidad de 2.000 libras que se utilizó en caso de emergencia

4.1.2 Materiales de laboratorio

Material de disección:

- a.-1 tijera mayo
- b.-1 bisturí con su mango respectivo
- c.-1 pinza anatómica
- d.- Bandeja para realizar la disección
- e.- Toalla nova
- f.- Portaobjetos
- g.- Tinciones: GRAM, GIEMSA, IFAT - U2

4.2 METODO

La totalidad de los peces fueron inoculados simultáneamente el día 29 de Abril, con U2 aislado de Puye, mediante diferentes vías:

- Grupo 1: vía intraperitoneal
- Grupo 2: vía intramuscular
- Grupo 3: vía oral (intubación)
- Grupo 4: mediante baño
- Grupo 5: control inoculado con MEM

4.2.1 Método de Inoculación

De cada acuario se sacaron la totalidad de los peces y se trasladaron a otro acuario con aireación propia, para los tres primeros grupos se tomaron cada vez 5 peces traspasándolos a un balde con 20 litros de agua previamente adicionado el anestésico BZ - 20® (1 : 50). Al momento que los peces estaban sedados se retiraban del agua y se inoculaban por 3 diferentes vías: intraperitoneal, intramuscular y oral esta última mediante intubación con una sonda de 1mm de diámetro y 10 cm de largo, adherida a una jeringa de tuberculina. Se utilizó 0.15 ml/pez de U2 aislado de Puye en concentración de 10 TCID₅₀/ml, luego se regresaban al acuario original. Para el grupo 4 (baño) los peces se traspasaron del acuario original a un balde con una concentración de 10 litros de agua y 50 ml del inoculo (10⁵ TCID₅₀ /ml), donde permanecieron por una hora para luego ser devueltos a su acuario original. El grupo control también fue inoculado el mismo día con 0.15 ml de medio de cultivo de células (MEM) no infectado vía intraperitoneal.

4.2.2 Confirmación de la mortalidad por U2

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

- Examen clínico interno y externo.
- Frotis sanguíneos para ser procesado mediante la tinción de GIEMSA.
- Implantas de hígado, bazo y riñón para tinción de GRAM.

- Frotis de tejido renal de los peces inoculados, para ser procesados mediante la técnica de IFAT - U2. Muestras fueron enviadas al laboratorio Aquatic Health ubicado en la ciudad de Puerto Montt.
- Frotis de tejido renal para microscopía electrónica. Las muestras se procesaron e interpretaron en el instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile.

5. RESULTADOS

5.1 Tasas de mortalidad diaria y acumulada.

5.1.1 Inoculación vía intraperitoneal e intramuscular.

Todos los peces inoculados por estas vías murieron, comprobándose que el organismo en estudio es el causante de la enfermedad, al encontrarse U2 en las muestras de cada uno de estos peces, estas fueron analizadas mediante tinción de GRAM, GIEMSA e IFAT - U2. En la tabla 1 se presentan las tasas de mortalidad diaria y acumulada para los peces inoculados vía intraperitoneal e intramuscular con el agente U2 aislado de Puye.

Tabla 1. Tasa de mortalidad diaria y acumulada en *S. salar* inoculados vía intraperitoneal e intramuscular con U2 aislado de Puye (*G. maculatus*) en dosis de 1.5×10^4 TCID₅₀/pez. (N=27).

DIA	INOCUL. INTRAPERITONEAL			INOCUL. INTRAMUSCULAR		
	MORTAL. NUMERO	DIARIA %	ACUMUL %	MORTAL. NUMERO	DIARIA %	ACUMUL. %
POST.INOC						
0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	3	11,1	11,1
19	2	7,4	7,4	0	0	11,1
20	0	0	7,4	2	7,4	18,5
21	1	3,7	11,1	0	0	18,5
23	0	0	11,1	4	14,8	33,3
24	5	18,5	29,6	0	0	33,3
26	4	14,8	44,4	0	0	33,3
27	3	11,1	55,5	3	11,1	44,4
28	4	14,8	70,3	1	3,7	48,1
29	4	14,8	85,1	3	11,1	59,2
30	3	11,1	96,2	0	0	59,2
31	1	3,7	99,9	2	7,4	66,6
33	0	0	99,9	1	3,7	70,3
34	0	0	99,9	3	11,1	81,4
46	0	0	99,9	1	3,7	85,1
48	0	0	99,9	4	14,8	99,9

En esta tabla se presentan los días en que se encontraron peces muertos o moribundos. De un total 27 peces inoculados vía ip y 27 vía im, murió el 100% entre los días 18 y 48 post - inoculación (Ver gráfico 1y 2).

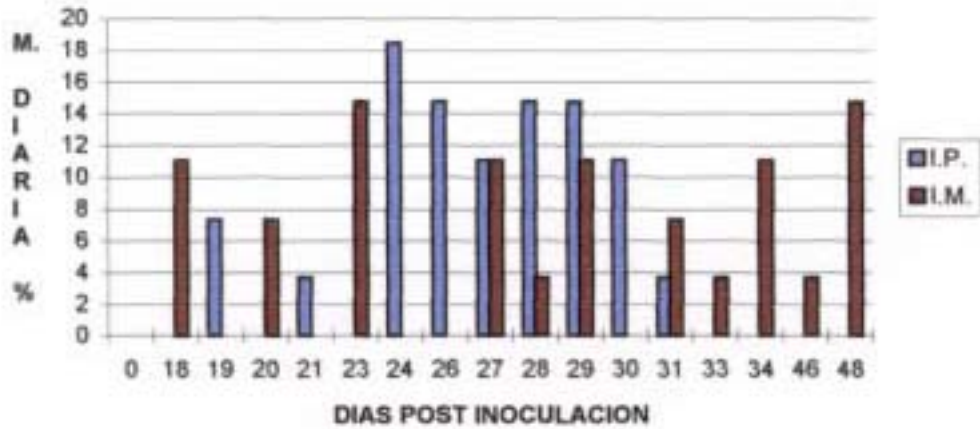


Gráfico 1: Tasa de mortalidad diaria de (*S. Salar*) para grupos inoculados vía I.P. e I.M. con U2 aislado de Puye (*G. maculatus*) en dosis 10^4 TCID₅₀ /pez.



Gráfico 2: Tasa de mortalidad acumulada (*S. Salar*) en grupos inoculados vía I.P. e I.M. con U2 aislado de Puye (*G. maculatus*) en dosis 10^4 TCID₅₀ /pez.

5.1.2 Inoculación vía oral

En los peces inoculados no se produjo mortalidad durante el período experimental que duró 48 días. Estos peces no mostraron signología clínica en todo el período de estudio. El último día del experimento los peces fueron sacrificados y en ninguno de ellos fue posible detectar el agente.

5.1.3 Inoculación vía baño

En los peces tratados mediante baño no fue posible detectar la presencia del agente. Se debe aclarar que la gran mayoría de los peces de este grupo murieron el día 19 post - inoculación, debido a estrés derivado del cambio de agua. Sólo uno de ellos sobrevivió y llegó al día final del experimento sin mostrar signología clínica externa e interna, tampoco fue posible detectar el agente.

5.1.4 Grupo control

No se produjeron mortalidades durante todo el periodo en ensayo. A la necropsia de los peces no se evidenciaron signos clínicos o lesiones macroscópicas, como tampoco se detectó U2.

5.2 Patología Macroscópica

5.2.1 Signos clínicos externos e internos

En los peces moribundos inoculados vía intraperitoneal e intramuscular se observó letargia y también natación errática, siempre a nivel de la superficie del agua. Presentando externamente pérdida de escamas, coloración normal o levemente oscura, palidez branquial, exoftalmia, aletas roídas y un estado de nutrición malo. Internamente se observó hepatomegalia, hígado pálido y hemorrágico, con diferentes grados de congestión y en algunos casos con nodulaciones de color blanquecino, vesícula biliar plétórica, esplenomegalia, renomegalia, estómago dilatado con un contenido mucoide amarillento, intestino hemorrágico. En la mayoría de los casos se observó ascitis serosanguinolenta además de petequias y equimosis en la grasa visceral. La foto uno muestra las lesiones de un alevín de Salmón del Atlántico inoculado con U2.



FOTO 1: Alevín de *Salmo salar* positivo a U2 muerto 30 días post - inoculación vía intraperitoneal.

5.2.2 Confirmación del agente inoculado

5.2.2.1 Tinción de Gram

Las improntas de hígado, bazo y riñón de cada uno de los peces inoculados ip e im, 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 riñón, aunque también se observaron en bazo e hígado (ver foto 2).

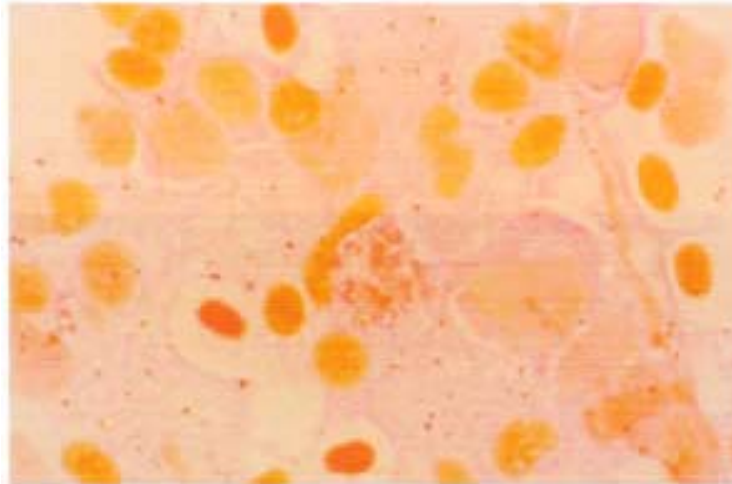


FOTO 2. Improntas de riñón teñidos con tinción de Gram, en la cual se puede observar microorganismos cocoides gram negativos, muy pequeños con ubicación tanto intracelular como extracelular. 1.000X.

5.2.2.2 Tinción de Giemsa

La tinción de Giemsa de los frotis de sangre reveló la presencia de cúmulos cocoides extracelulares y en el citoplasma de Macrófagos (ver foto 3).

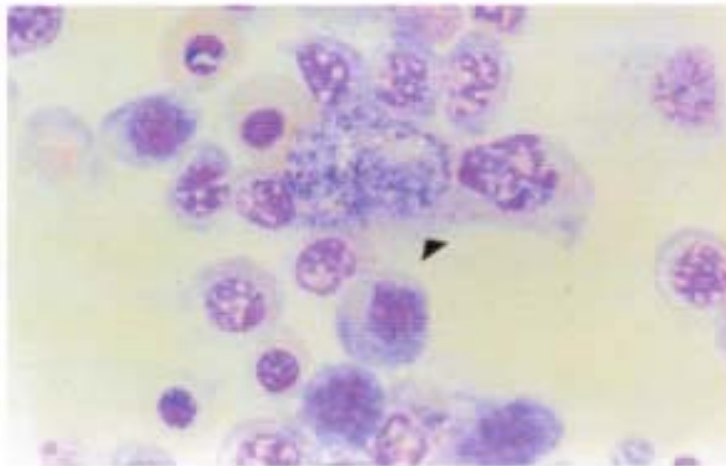


FOTO 3. Frotis de sangre con tinción de Giemsa en la cual se puede apreciar microorganismos cocoides de tamaño muy pequeño intracelulares (flecha), además se observan eritroblastos y eritrocitos maduros. 1.000X.

5.2.2.3 Inmunofluorescencia indirecta de U2 (IFAT - U2)

La foto 4 muestra un frotis hepático de *S. Atlántico* con fluorescencia específica que revela la presencia del agente U2 inoculado.

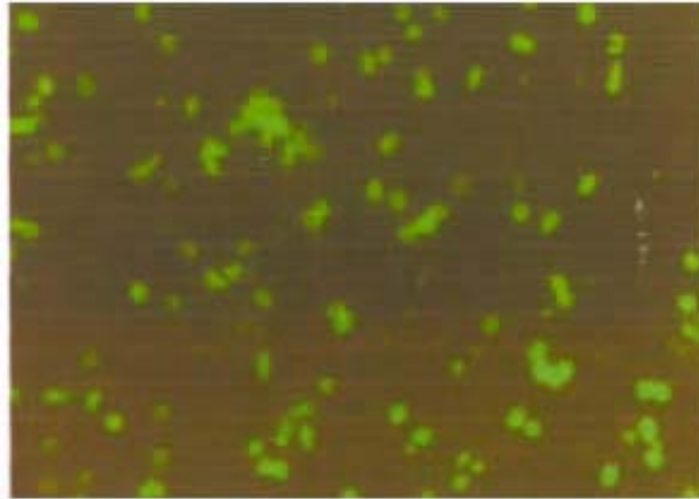


FOTO 4. Inmunofluorescencia indirecta específica para U2 (IFAT - U2). Se observan formas cocoides intra y extracelulares en niveles de 1.000 a 8.000 / 100 campos microscópicos. 1000X.

5.2.6 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 electro denso en la periferia (Foto 5), características de organismos rickettsia-like.

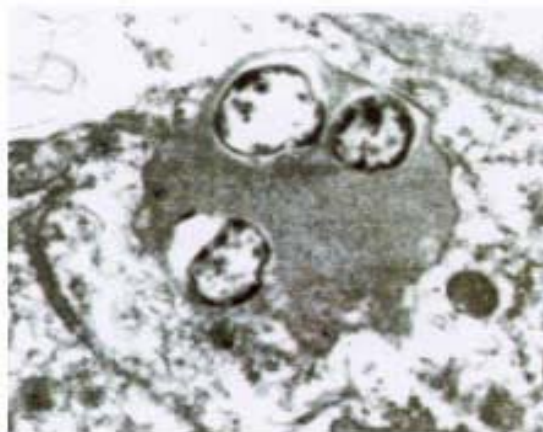


FOTO 5: Microfotografía de bazo de Salmón del Atlántico inoculado i.p. con U2 (RLO) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*). 7.500X

6. DISCUSION

Este estudio se realizó con el objetivo de determinar las vías de contagio de U2 (RLO : Organismo semejante a *Rickettsia*) en salmones del Atlántico (***Salmo salar***). Para ello se inoculó vía i.p., i.m., oral y por baño con U2 aislado de Puyes (***Galaxias maculatus***) colectados del lago Llanquihue.

Luego de infectar los alevines mediante estas diferentes vías se pudo determinar que en los peces inoculados i.p. e i.m. se reprodujo la enfermedad presentando signos clínicos evidentes y mortalidad asociada.

Clínicamente, se observó en los peces inoculados vía i.p. e i.m. letargia y también natación errática, siempre a nivel de la superficie del agua. Presentando externamente pérdida de escamas, coloración normal o levemente oscura, palidez branquial, exoftalmia, aletas roídas y un estado de nutrición malo. Internamente se observó hepatomegalia, hígado pálido y hemorrágico, con diferentes grados de congestión y en algunos casos con nodulaciones de color blanquecino, vesícula biliar pictórica, esplenomegalia y renomegalia, estómago dilatado con un contenido mucoso amarillento e intestino hemorrágico. En la mayoría de los casos se observó ascitis serosanguinolenta, petequias y equimosis en grasa visceral, características que concuerdan con las descritas por Enríquez y col. (1898) para Puyes enfermos de U2 y Cvitanich y col. (1995) quien las describe para salmones del Atlántico naturalmente infectados. Además, estas lesiones son similares a las producidas por ***P. salmonis*** en Salmones del Atlántico afectados por Piscirickettsiosis (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich y col., 1991; Branson y Nieto, 1991). Esto indica que U2 de Puye es patógeno para S. Atlántico ya que se reprodujo y desarrolló la enfermedad. Además se podría considerar como una fuente de infección para S. Atlántico de cultivo en el lago Llanquihue. Es necesario realizar un estudio epidemiológico para determinar si U2 tuvo su origen en Puyes (***G. maculatus***) para luego infectar a Salmón del Atlántico o viceversa.

Entre los signos clínicos de Piscirickettsiosis ha sido descrita exoftalmia bilateral, estomatitis ulcerativa y equimosis periocular (Branson y Nieto, 1991; Cvitanich y col., 1991). Esto último no fue observado en la infección por U2 en este experimento.

Las mortalidades observadas en este ensayo, comenzaron el día 18 p.i para el grupo i.m. y el día 19 para el grupo i.p. El día 31 p.i. se había producido el 100% de mortalidad para el grupo i.p y el día 48 p.i. para el grupo i.m. (Tabla 1).

Este 100% de mortalidad encontrado en Salmón del Atlántico puede estar influido por la reinfección de los peces debido a la recirculación del agua en este ensayo, y también por la susceptibilidad de la especie a este agente, ya que estos resultados indican que U2 produjo un cuadro severamente agudo. Las tasas de mortalidad que describe Cvitanich y col. (1995) para Salmón del Atlántico naturalmente infectados fueron de 4 al 12% semanal en fase de agua dulce, situación que persiste en la fase marina hasta la sexta semana, lo que indica la patogenicidad de U2 para *S. atlántico*.

Al análisis microscópico, U2 se observó como un organismo gram negativo de forma esférica o cocoide, frecuentemente pleomórfico ubicado en cúmulos intracelulares y extracelulares, lo que concuerda con lo descrito por Cvitanich y col. (1995). La gran cantidad del microorganismo que se encontraron en riñón y bazo, estaría indicando la posibilidad de ser los órganos, blanco, de donde el agente originaría la septicemia e infección sistémica con desarrollo de lesiones en diferentes órganos y tejidos.

Cvitanich y col. (1995) no detectó U2 en frotis de sangre de *S. Atlántico* naturalmente infectados. Sin embargo, en este estudio se detectó mediante la tinción de Giemsa, que los peces clínicamente enfermos desarrollaron una septicemia con presencia de cúmulos cocoides en el citoplasma de macrófagos circulantes a nivel sanguíneo, lo que se describe también para la infección por *P. salmonis*. Los macrófagos serían usados como vehículos para la diseminación de la enfermedad en el organismo, lo que es necesario corroborar en otros estudios. También se observó gran cantidad de eritrocitos inmaduros, lo que asociado a la palidez branquial observada en el examen clínico, nos revela una anemia de tipo regenerativa. La enfermedad causada por U2 en Salmón del Atlántico corresponde a una septicemia.

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

La ausencia de peces positivos y de signos clínicos en los grupos inoculados vía baño y oral, nos indicaría que estas no son vías de contagio del agente en estudio, aunque esto no es concluyente, ya que existen otros factores que podrían influir en la infección por U2. Por ejemplo, que la dosis de inoculación haya sido demasiado baja para el desarrollo de la enfermedad a través de estas vías, que el período de incubación del agente sea superior a los 48 días para la vía oral o que el pH ácido 3,2 -3,5 del estómago de los salmonídeos, sea limitante para la infección vía oral de U2. Esta posibilidad se describe para la infección oral de ***P. salmonis*** (Larenas y col., 1995).

Podríamos concluir entonces que la vía oral, al igual que *P. salmonis*, no es una vía de contagio para U2. Debido a que en este grupo a pesar de haber permanecido hasta el final del estudio no se encontraron peces positivos ni signología clínica asociada. En el caso de la vía por baño, al hacer una comparación con *P. salmonis*, se ha establecido que la sobrevivencia de esta es muy baja en agua dulce, lo que también podría ser semejante para U2. Esto podría explicar la ausencia de positividad en este grupo. Desafortunadamente estos peces no sobrevivieron hasta el final del ensayo, muriendo su totalidad el día 19 p.i. motivo por el cual no se habría alcanzado a desarrollar la enfermedad, recordemos que según este estudio el período de incubación de la enfermedad sería al menos de 18 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 marina (Cvitanich y col., 1995).

Enríquez y col. (1998) reportó el primer hallazgo de U2 en una especie silvestre de agua dulce (*G. 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 o también viceversa. Ya sea en forma directa o a través de vectores, cosa que no fue posible determinar en este trabajo.

Por tratarse de agentes rickettsiales (SRS, U2) para los cuales aún 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, minimizando toda actividad que signifique estrés para los peces.

7. CONCLUSIONES

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

1.- Salmón del Atlántico (***Salmo salar***) es susceptible a la inoculación vía i.p e i.m de U2 aislado de Puye (***Galaxias maculatus***).

2.- La vía oral no produjo contagio del agente U2 aislado de Puye (***G. maculatus***) en Salmón del Atlántico (***S. salar***).

3.- La vía baño no sería un posible medio de contagio del agente U2 aislado de Puye (***G. maculatus***) en Salmón del Atlántico (***S. salar***) . Se necesitaran posteriores estudios para confirmar esto.

4.- El agente U2 aislado de Puye (***G. maculatus***) es patógeno para Salmón del Atlántico (***S. salar***).

8.- BIBLIOGRAFIA

ALMENDRAS, F., L.C. FUENTEALBA, S.R.M. JONES, F. MARKHAM, E. SPANGLER. 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater raised Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish dis.* 20: 409 - 418.

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

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

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

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

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

BUSTOS, P. 1993. Pérdidas por enfermedades bacterianas de Salmonídeos en Chile. *Aquanoticias Internacional* 15: 4 -13.

BUSTOS, P., P. ENTRALA, J. MONTAÑA, J. CALBUYAHUE. 1994. Septicemia *Rickettsial Salmonidea* (SRS), estudio de transmisión vertical en Salmón Coho (*O. Kisuth*), En: Seminario Patología y Nutrición en el Desarrollo de la Acuicultura, Puerto Montt, Chile. Pp. 33 -40.

CUBILLOS, V., C. FARIAS, 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/AFS Newsletter* 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 Kochs postulate. *J. Fish Dis.* 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.

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 Epizootia Disease in Salmonid Fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 120 -126.

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.

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.

LARENAS J., L. HIDALGO, H. GARCES, J. FRYER, P. SMITH. 1995. Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del Atlántico (*S. salar*) infectados naturalmente con Piscirickettsia salmonis. *Avances en ciencias veterinarias* 10: 53 - 58.

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

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

VIDAL, L. 1999. Balance de la acuicultura en 1998. *Aquanoticias Internacional* 48: 6 - 13.

ANEXOS

ANEXO N° 1

INOCULACION INTRAPERITONEAL

día post-inoculación	GRAM			GIEMSA	PESO
	HIGADO	BAZO	RIÑON		
19	+	++	+++	+	24
19	++	++	++	++	26
21	+	+++	+++	+++	20
24	+++	++	++	++	19
24	+	++	+++	+	21
24	+	+	+++	+	21
24	-	+	+++	+	24
24	-	++	++	+++	18
26	+	+	++	+++	22
26	++	++	+++	++	25
26	+	+++	+++	+++	20
26	+	+	+++	++	20
27	++	+++	+++	-	22
27	+	++	+++	-	23
27	+++	++	++	++	21
28	-	++	+++	++	28
28	+	+	++	+++	25
28	-	+++	++	+++	22
28	+	-	++	+++	18
29	++	-	++	-	26
29	+	+	+	++	21
29	++	++	-	-	20
29	+	++	++	-	25
30	+	++	+++	+	21
30	+++	+++	+++	-	28
30	+++	+++	+++	++	19
31	+++	+++	++	+	18

Poca cantidad	+
Moderada cantidad	++
alta cantidad	+++

NEGATIVO	-
-----------------	---

ANEXO N° 2
INOCULACIÓN INTRAMUSCULAR

día post-inoculación	GRAM			GIEMSA	PESO
	HIGADO	BAZO	RIÑÓN		
18	+	++	-	+	23
18	-	+	+++	+	20
18	+	++	+	-	25
20	++	+	+++	++	24
20	-	+++	+	+	24
23	-	-	++	+++	23
23	++	++	-	+	25
23	-	+	+	-	28
23	+++	++	+	-	20
27	++	++	+++	++	19
27	++	+++	+	+	22
27	+	+	+++	+	25
28	-	++	++	++	26
29	+	++	+	++	30
29	-	++	+++	+	29
29	++	+++	++	-	20
31	++	+++	+++	++	19
31	+++	-	++	++	25
33	+	-	-	++	26
34	++	-	++	+	32
34	+++	++	++	+++	25
34	+++	+	+++	+	34
46	++	+++	+++	-	25
48	+++	+	+++	+	20
48	++	++	++	+	29
48	+++	-	+	++	28
48	+++	++	+++	-	21

Poca cantidad	+
Moderada cantidad	++
alta cantidad	+++

NEGATIVO	-
-----------------	----------

ANEXO N° 3

INOCULACION VIA ORAL

día post-inoculación	GRAM			GIEMSA	PESO
	HIGADO	BAZO	RIÑON		
48	-	-	-	-	34
48	-	-	-	-	30
48	-	-	-	-	32
48	-	-	-	-	29
48	-	-	-	-	25
48	-	-	-	-	34
48	-	-	-	-	36
48	-	-	-	-	26
48	-	-	-	-	28
48	-	-	-	-	27
48	-	-	-	-	30
48	-	-	-	-	39
48	-	.	-	-	30
48	--	-	-	-	31
48	-	-	-	-	26
48	-	-	-	-	29
48	-	-	-	-	26
48	-	-	-	-	24
48	-	-	-	-	33
48	-	-	-	-	32
48	-	-	-	-	26
48	-	-	-	-	28
48	-	-	-	-	26
48	-	-	-	-	22
48	-	-	-	-	24
48	-	-	-	-	32
48	.	-	-	-	34

Poca cantidad	+
Moderada cantidad	++
alta cantidad	+++

NEGATIVO	-
----------	---

ANEXO N° 4

INOCULACION VIA BAÑO

día post-inoculación	GRAM			GIEMSA	PESO
	HIGADO	BAZO	RIÑON		
19	-	-	-	-	20
19	-	-	-	-	16
19	-	-	-	-	18
19	-	-	-	-	17
19	-	-	-	-	22
19	-	-	-	-	23
19	-	-	-	-	24
19	-	-	-	-	19
19	-	-	-	-	19
19	-	-	-	-	16
19	-	,	-	-	18
19	-	-	-	-	15
19	-	-	-	-	23
19	-	-	-	-	20
19	-	-	-	-	23
19	-	-	-	-	22
19	-	-	-	-	21
19	-	-	-	-	19
19	-	-	-	-	19
19	-	-	-	-	25
19	-	-	-	-	24
19	-	-	-	-	18
19	-	-	-	-	26
19	-	-	-	-	22
19	-	-	-	-	17
19	-	-	-	-	20
48	-	-	-	-	26

Poca cantidad	+
Moderada	++
alta cantidad	+++

NEGATIVO	-
----------	---

ANEXO N° 5

CONTROL

día post-inoculación	GRAM			GIEMSA	PESO
	HIGADO	BAZO	RIÑON		
50	-	-	-	-	30
50	-	-	-	-	30
50	-	-	-	-	29
50	-	-	-	-	38
50	-	-	-	-	34
50	-	-	-	-	35
50	-	-	-	-	31
50	-	-	-	-	27
50	-	-	-	-	24
50	-	-	-	-	35
50	-	-	-	-	38
50	-	-	-	-	29
50	-	-	-	-	36
50	-	-	-	-	40
50	-	-	-	-	36
50	-	-	-	-	29
50	-	-	-	-	42
50	-	-	-	-	38
50	-	-	-	-	36
50	-	-	-	-	35
50	-	-	-	-	35
50	-	-	-	-	39
50	-	-	-	-	26
50	-	-	-	-	33
50	-	-	-	-	40
50	-	-	-	-	36
50	-	-	-	-	44

Poca cantidad	+
Moderada cantidad	++
alta cantidad	+++

NEGATIVO	-
-----------------	---

ANEXO N°6**GRAM:**

Materiales:

Cristal Violeta.
Lugol.
Alcohol.
Safranina.

Técnica:

- a.- Fijar el extendido de 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 minuto.
- 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° 7

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° 8

IFAT- U2:

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 disolución de trabajo del segundo Ac anti-U2 e incubar en cámara húmeda por 30 min a temperatura ambiente.
- g.- Lavar la muestra por 10 minutos en agitación con PBS por 5 minutos.
- 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.- Agregar 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:

- 0.01 M PBS (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 - $7\text{H}_2\text{O}$ - 53.7 gr/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.