

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGIA ANIMAL

DESCRIPCIÓN DE LA FURUNCULOSIS PRODUCIDA POR *Aeromonas salmonicida*
SUBESPECIE *achromogenes* Y SUBESPECIE *salmonicida* EN SALMÓN DEL
ATLÁNTICO (*Salmo salar*).

Memoria de Título presentada
como parte de los requisitos para
optar al TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO.

EDUARDO DAVID GONZÁLEZ KANTER

VALDIVIA – CHILE

2002

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. RICARDO ENRIQUEZ S.

PROFESORES COLABORADORES:

Dr. VICTOR CUBILLOS G.

T.M. MÓNICA MONRÁS S.

PROFESORES CALIFICADORES:

Dr. ESTEBAN MOLINARI L.

Dr. GASTÓN VALENZUELA J.

FECHA DE APROBACIÓN: 13 DE SEPTIEMBRE DE 2002

INDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODO	12
5. RESULTADOS	17
6. DISCUSIÓN	28
7. CONCLUSIONES	35
8. BIBLIOGRAFÍA	37
9. ANEXOS	40

1. RESUMEN

DESCRIPCIÓN DE LA FURUNCULOSIS PRODUCIDA POR *Aeromonas salmonicida* SUBESPECIE *achromogenes* Y SUBESPECIE *salmonicida* EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).

Con el propósito de reproducir la condición conocida como Furunculosis, comparar las tasas de mortalidad y realizar un estudio anatomopatológico, además de observar el comportamiento en agua dulce y en agua salada, se desafiaron 270 peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con dos cepas de *Aeromonas salmonicida*, una típica (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* – **A.s.s**) y otra atípica (*Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* – **A.s.a**) esta última aislada en Chile. Los peces fueron mantenidos una semana en estanque plástico de 300 l con agua a 8-10°C, administrándose aireación constante y alimentación durante su aclimatación. Durante dicho periodo se realizó el chequeo sanitario de acuerdo al protocolo de la Oficina Internacional de Epizootias.

Los peces entre 15 y 20 g de peso se anestesiaron con BZ 20^{®1}, para luego ser inoculados intraperitonealmente con una dosis de 0,1 ml de una suspensión bacteriana, a una concentración de 10⁸ ufc/pez, determinado mediante densidad óptica a 600 nm. Se dispusieron de seis acuarios de 80 l (cada uno con 35 peces), dos de los cuales correspondían a peces inoculados con **A.s.a**, mantenidos en agua salada y dulce respectivamente, otros dos acuarios contenían peces inoculados con **A.s.s** en idénticas condiciones y dos acuarios controles, los que fueron inoculados con 0.1 ml de solución fisiológica estéril (0.85% NaCl).

El presente estudio consistió en: estudio anatomopatológico (necropsia e histopatología), hematológico (hematocrito) y bacteriológico (cultivo bacteriano y tinción de Gram).

Los resultados obtenidos muestran que la mayor patogenicidad se observó en peces inoculados con **A.s.a** en agua salada (100% mortalidad), siguiendo en orden decreciente los inoculados con idéntico en agua dulce (88,6% mort.), los peces inoculados con **A.s.s** en agua salada (82,9% mort.) y dulce (74,3% mort.) respectivamente. Sin embargo, la mortalidad de **A.s.s** se observó precozmente.

Se destaca el hecho que inoculaciones con **A.s.a** causaron mayor grado de patogenicidad, apreciando porcentajes superiores de daño tisular tanto macro (externo e interno) como microscópicamente, de igual forma, se pudo constatar que los grupos más afectados se encontraban en agua salada.

Palabras claves: *Aeromonas salmonicida*, Furunculosis, inoculación experimental, *Salmo salar*.

¹ Ethil P-Aminobenzoato. Lab. Veterquímica. Camino Melipilla #5641. Santiago-Chile.

2. SUMMARY

DESCRIPTION OF FURUNCULOSIS CAUSED BY *Aeromonas salmonicida* SUBSPECIE *achromogenes* AND SUBSPECIE *salmonicida* IN ATLANTIC SALMON (*Salmo salar*).

The goal of the study was to reproduce the condition known as Furunculosis, to compare the mortality-rates follow by an anatomopathological analysis of fish maintained separately in both fresh and seawater. 270 Atlantic Salmon (*Salmo salar*) were challenged with two different strains of *Aeromonas salmonicida*, a typical strain (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* – **A.s.s**) and one atypical (*Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* – **A.s.a**) the former isolated in Chile. Fish were kept for one week in 300 liter plastic tanks at 8-10°C, with constant aeration and feeding during their acclimation. During such period a sanitary checking was carried out according to the protocol recommended by the Office International des Epizooties.

The fish between 15 and 20 g body weight were anaesthetized with BZ 20^{®1}, and then inoculated intraperitoneally with a dose of 0,1 ml of a bacterial suspension, concentrated at 10⁸ cfu/fish, determined through optical density at 600 nm. Six plastic tanks of 80 l were used (each one with 35 fish), two of them belonged to fish that had been inoculated with **A.s.a**, kept in seawater and freshwater respectively, two other plastic tanks contained fish inoculated with **A.s.s** in identical conditions and two controls plastic tanks, containing fish inoculated with 0,1 sterile saline solution (0,85% NaCl) instead of bacterial suspension.

The anatomopathological study included necropsy and histopathology, hematocrit, and a bacteriological analysis (bacterial culture and Gram stain).

The result obtained showed that the highest pathogenicity was shown in fish inoculated with **A.s.a** in seawater (100% mortality), followed by **A.s.a** in freshwater (88,6% mort.), **A.s.s** in seawater (82,9% mort.) and finally **A.s.s** in freshwater (73,3% mort.) respectively. However, the mortality of **A.s.s** was observed very early in the period.

The inoculations with **A.s.a** caused a higher degree of pathology, being observed greater percentages of tissue damage both macro (external and internal) as well as microscopically. Besides the most affected groups were found in seawater.

Key words: *Aeromonas salmonicida*, Furunculosis, experimental inoculation, *Salmo salar*.

¹ Ethil P-Aminobenzoato. Lab. Veterquímica. Melipilla Road #5641. Santiago-Chile.

3. INTRODUCCIÓN

Chile es actualmente el segundo productor mundial de salmónidos, sólo superado por Noruega. En el ámbito local se cultivan cuatro especies: Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) única especie del Atlántico, Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), Salmón Rey (*Oncorhynchus tshawytscha*) y Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Méndez y Munita, 1989; Lozano, 2000).

Existen aproximadamente más de 40 empresas dedicadas al cultivo del salmón, las cuales operan cerca de 1.400 centros de cultivos. Existen también cerca de 190 pisciculturas, las cuales cuentan con una superficie de alrededor de 4.700 hectáreas, distribuidas geográficamente en las cuatro regiones más australes de Chile. Los principales mercados de destinos de las exportaciones de salmónidos son Japón, Estados Unidos, Brasil y los países de la Unión Europea. Su comercialización se realiza a través de las modalidades fresco-refrigerado y congelado (Méndez y Munita, 1989).

Sin embargo, toda esta actividad de enorme proyección puede verse seriamente afectada si no se consideran algunas limitantes propias de la producción intensiva de salmones y truchas. El principal problema a corto o largo plazo en el éxito de la salmonicultura está relacionado con la presencia de enfermedades en los peces (Trust, 1986).

Las enfermedades en los peces no se deben a una causa única, sino que son producto de una estrecha interacción entre: ambiente acuático, pez y agente patógeno. Los microorganismos pueden actuar como patógenos primarios y/o ser invasores oportunistas o secundarios de un pez susceptible, causando un proceso patológico (Roberts, 1981).

En este contexto, el género *Aeromonas* produce cuantiosas pérdidas en peces al provocar principalmente enfermedades septicémicas y ulcerativas. La de mayor importancia es la "Furunculosis", cuyo agente causal es *Aeromonas salmonicida* y que afecta principalmente a peces del género *Salmo*. Esta condición es una de las enfermedades bacterianas más importantes en la acuicultura de salmónidos, debido a los costos económicos relacionados con mortalidad, prevención y control (O'Brien y col., 1994).

El término Furunculosis fue dado por analogía con la Furunculosis humana a causa de la aparente semejanza a un furúnculo encontrado en algunos casos de lesiones clínicas. Este nombre no corresponde a una adecuada descripción de la lesión necrótica con compromiso de la musculatura y eventuales úlceras que caracterizan el desarrollo crónico de la enfermedad en

salmones adultos, teniendo poco en común con la presencia de material purulento en la piel de los humanos. Sin embargo, este nombre está muy difundido a nivel mundial en la literatura como para considerar su corrección (Inglis y col., 1993; Austin y Austin, 1999).

3.1 ASPECTOS TAXONOMICOS

Desde la publicación del Manual Bergey's de Bacteriología (Popoff, 1984), se ha propuesto que el género *Aeromonas* sea removido desde la familia *Vibrionaceae* y colocado en una nueva familia llamada *Aeromonadaceae* (Austin y Austin, 1987), sin embargo, en la 9ª Edición del Manual Bergey's (1994), se retiene el género *Aeromonas* dentro de la familia *Vibrionaceae*, sin perjuicio a la validez de esta propuesta (Holt y col., 1994).

A diferencia del grupo de las *Aeromonas* móviles, *Aeromonas salmonicida* y sus subespecies se conocen como *Aeromonas* "inmóviles". En la 9ª edición del Manual Bergey, Popoff (1984) reconoce solamente una sola especie de *Aeromonas* inmóviles, la cual se divide a su vez en tres subespecies: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* (Enríquez y col., 1989).

Aeromonas salmonicida fue aislada por primera vez en Alemania en un cultivo de truchas por Emmerich y Weibel en 1894 y descrita como *Bacillus salmonicida*. Este organismo fue más tarde reclasificado bajo el género *Aeromonas* (McCarthy y Roberts, 1980; Inglis y col., 1993; Gudmundsdóttir, 1998).

La subdivisión en tres subespecies, *salmonicida*, *achromogenes* y *masoucida*, está basada en una gran variedad de propiedades, sin embargo, estudios de ADN indican valores muy altos en el nivel de homología, sugiriendo que la clasificación en subespecies es innecesaria (Kitao y col., 1984; Stoskopf, 1992; Inglis y col., 1993; Bernoth, 1997).

Aeromonas salmonicida es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, inmóvil, no esporulado ni encapsulado, mide aproximadamente 1,3-2,0 por 0,8-1,3 μm , con formas variables de una cepa a otra, crecen y se mantienen óptimamente en medios nutritivos con 0.85% de sal y temperaturas entre 22 a 28°C, no creciendo a temperaturas mayores de 37°C (Paterson y col., 1980; Austin y Austin, 1987; Roberts, 1989; Inglis y col., 1993; Bernoth, 1997; Hiney y Olivier, 1999).

Cepas virulentas adquieren generalmente una forma cocoídea, mientras que cepas avirulentas corresponden a la clásica forma de un bacilo (Enríquez y col., 1989).

McCarthy y Roberts (1980) propusieron otra división diferente entre las tres subespecies, basados en un criterio epizootiológico, el cual es sostenido por Belland y Trust (1988), estas son: *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* (incorpora a esta subespecie la subespecie *masoucida* de Shubert) y *Aeromonas salmonicida subsp. nova* (Kitao y col., 1984; Inglis y col., 1993).

- a) *A. salmonicida subsp. salmonicida* (A.s.s). Incorporan las cepas típicas, aisladas de salmonídeos. Es la más común, su principal característica es su capacidad de producir un pigmento de color marrón-café en agar TSA o Müller-Hinton. Los aislados de salmónidos producen pigmentos en 2-3 días 25°C.
- b) *A. salmonicida subsp. achromogenes* (A.s.a). En esta subespecie se relacionan todas las cepas atípicas de *Aeromonas salmonicida*. Su característica principal es su incapacidad de producir pigmento en medios sólidos (Agar TSA).
- c) *A. salmonicida subsp. nova*. Incluye las cepas atípicas asociadas a enfermedades de peces salmonídeos y no salmonídeos, las cuales no todas producen pigmento y requieren sangre o suero para su crecimiento.

Una cuarta subespecie atípica a sido propuesta por Austin y Austin (1989), la cual es denominada *Aeromonas salmonicida subsp. smithia* (Bernoth, 1997).

Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida es el agente causal de la Furunculosis clásica, la cual es denominada “Furunculosis típica”, diferenciándose de otras cepas atípicas. Esta bacteria a sido descrita en una taxonomía homogénea, con respecto a sus características bioquímicas y genotípicas, por el contrario, el grupo de las cepas de *Aeromonas salmonicida* atípicas (como *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes*) consisten en aislados que mantienen una larga variedad en sus características bioquímicas, moleculares y de virulencia (Gudmundsdóttir, 1998; Hiney y col, 1999).

Los aislados atípicos están caracterizados por poseer propiedades bioquímicas diferentes de aquellas descritas para *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* (Anexo 1). Algunas de estas diferencias se refieren a que los aislados atípicos no producen pigmentación café del medio y tienen un crecimiento más lento (Paterson y col., 1980; Gudmundsdóttir, 1998).

3.2 ESPECIES SUSCEPTIBLES

Tanto **A.s.a** como **A.s.s** afectan a todas las especies de la familia *Salmonidae*, con un amplio rango de especies en agua dulce, salobre o agua salada. Sin embargo, existen variaciones en la susceptibilidad en cada grupo de peces (Post, 1983; Gudmundsdóttir, 1998; Hiney y Olivier, 1999; Laidler y col., 1999).

3.3 DISTRIBUCION GEOGRÁFICA

Actualmente el patógeno se distribuye mundialmente, con excepción de Australia y Nueva Zelanda. Las cepas atípicas se encuentran principalmente en regiones templadas del hemisferio norte, como Canadá, USA, Japón y centro y norte de Europa, incluyendo los países Nórdicos. Sin embargo, las cepas atípicas también han sido aisladas en Australia y en el mediterráneo (Austin y Austin, 1987; Inglis y col., 1993).

En Chile la Furunculosis atípica fue diagnosticada por primera vez en noviembre de 1995 en uno de cuatro stock de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), criados en balsas jaulas marinas en un lugar cercano a Puerto Montt (Bravo, 1999). En esta área, los centros de cultivo de peces han usado ovas de salmón importadas desde países donde *Aeromonas salmonicida* atípica es endémica (Gudmundsdóttir, 1998).

Los peces afectados tenían un peso de 900 g y la temperatura del agua se encontraba alrededor de los 11°C. Los otros tres stocks se encontraban negativos a la presencia de la enfermedad, aunque los peces se criaron juntos en el mismo sitio. La enfermedad en el grupo afectado fue controlada con flumequina por 14 días, sin embargo, en la primavera del siguiente año un segundo brote se produjo en el grupo afectado cuando los peces pesaban más de cuatro kilos, para evitar que la enfermedad se extienda, todo el stock de peces fue cosechado. Desde ese tiempo, la Furunculosis atípica no se ha reportado nuevamente en el área de Puerto Montt (Bravo, 1999).

Durante Octubre de 1998, la enfermedad apareció a unas 50 millas náuticas al sur del centro de cultivo donde la enfermedad fue diagnosticada en 1995. Inicialmente, Furunculosis atípica fue reportada sólo entre uno de cinco centros localizados en el área de Llanquihue, donde sólo fueron estudiados salmones de Atlántico. El peso de los peces infectados en esta nueva localidad fue alrededor de 670 g y la temperatura del agua fue de 11°C. En Diciembre de 1998, la enfermedad se expandió simultáneamente de tres a cinco centros de cultivos de Salmón del Atlántico, y en Marzo de 1999 la enfermedad se extendió a la totalidad de los centros de la localidad (Bravo, 1999).

Hasta la fecha en Chile, no ha sido reportada la Furunculosis atípica entre peces de agua dulce u otros centros de cultivos. Debido a la aparente rápida propagación de la enfermedad, es posible que la distribución geográfica de *Aeromonas salmonicida* sea extensiva en el agua marina de Chile (Bravo, 1999).

3.4 EPIZOOTIOLOGÍA

La Furunculosis de los salmónidos en una explotación de agua dulce o salada es consecutiva, generalmente, a la introducción de peces enfermos o portadores asintomáticos de la bacteria, actuando el agua y los equipos de la piscicultura como vehículos del germen. En el ambiente silvestre los salmónídeos anádromos poseen un importante rol en la transmisión de esta enfermedad por presentar infecciones subclínicas latentes (Roberts, 1981; Post, 1983).

El principal mecanismo de infección de *Aeromonas salmonicida* es por medio de la transmisión horizontal, siendo las vías digestivas, percutánea y branquial las rutas más comunes de infección (Post, 1983). Como el organismo puede ser eliminado a través de fluidos reproductivos, la transmisión vertical también puede ocurrir, aunque existen evidencias que indican que es una probabilidad muy escasa (McCarthy y Roberts, 1980; Heen y col., 1993).

Aeromonas salmonicida posee un amplio rango de hospedadores, sin embargo, es un patógeno obligado del pez, que puede sobrevivir por algunas semanas fuera del hospedador, dependiendo de la salinidad, pH, temperatura y niveles de detritus del agua, además puede sobrevivir tanto en el agua dulce como en el agua salada (McCarthy y Roberts, 1980; Bernoth, 1997).

El período de incubación de la Furunculosis es dependiente de la temperatura del agua. Peces susceptibles en aguas con una temperatura de 20°C pueden desarrollar casos de Furunculosis dentro de los 4 a 12 días siguientes. Es posible que los signos externos de la enfermedad nunca se presenten en peces susceptibles si la temperatura del agua está por debajo de los 8°C (Post, 1983).

La enfermedad, coincide, salvo excepciones, con daño físico, altas temperaturas, concentraciones bajas de oxígeno, presencia de ectoparásitos y otras enfermedades, dieta, sobrepoblación, afectando a peces de cualquier edad, sin embargo los más jóvenes son los más afectados (Entrala, 1989; Hiney y Olivier, 1999; Plumb, 1999).

Se ha observado una marcada estacionalidad en la incidencia de la Furunculosis, tanto en peces cultivados como en los de vida libre, el aumento de las temperaturas como el proceso de

smoltificación están implicados en esta aparente estacionalidad. El proceso de smoltificación está asociado con los mayores cambios fisiológicos, incluyendo la elevación de los niveles de cortisol, lo que genera una severa depresión en los sistemas de defensa del pez e incrementa la susceptibilidad a las infecciones bacterianas. Las altas temperaturas (primavera-verano) incrementan los brotes de Furunculosis tanto en agua dulce como salada. De hecho la alta temperatura es el principal factor que influencia el desarrollo de la Furunculosis, no solo a nivel de respuesta al estrés, sino también a nivel del patógeno, ya que se ha demostrado que la multiplicación de *Aeromonas salmonicida* en la sangre coincide con el aumento de la temperatura del agua (Hiney y Olivier, 1999).

3.5 SIGNOS CLÍNICOS

La Furunculosis se encuentra en el grupo de las enfermedades septicémicas causadas por bacterias Gram negativas. Al respecto, hay una considerable variación en la descripción clínica y patológica dependiendo de la patogenicidad de la cepa infectante (Roberts y Sheperd, 1980). Esta condición puede presentar una de cuatro formas clínicas dependiendo de la patogenicidad del agente, la edad del pez, grado de inmunidad y la importancia de factores externos como la temperatura (Enríquez y col., 1989; Del Valle, 1992).

Las formas de la enfermedad, tanto para la enfermedad causadas por cepas típicas y atípicas, varían desde:

3.5.1 Furunculosis hiperaguda o asintomática

En la cuál se presenta mortalidad sin lesiones evidentes.

3.5.2 Furunculosis aguda o subaguda

En peces en crecimiento, la Furunculosis tiende a ocurrir en forma aguda, la que se manifiesta clínicamente por una septicemia bacteriana generalizada. Debido a la corta duración de la enfermedad el desarrollo de furúnculos es inusual. Los peces muestran signos de una septicemia hemorrágica, presentando hemorragias locales en la piel, sobre todo en el área de inserción de las aletas pares. En la musculatura y en el hígado se aprecian petequias. La Furunculosis se caracteriza por exoftalmia, coloración oscura de la piel, esplenomegalia, nefritis y enteritis (McCarthy y Roberts, 1980; Enríquez y col., 1989; Hiney y Olivier, 1999).

3.5.3 Furunculosis crónica

Esta forma es más común en peces adultos, se caracteriza por las típicas lesiones, con presencia de abscesos en la piel, los que se transforman posteriormente en furúnculos. En los casos más crónicos los furúnculos se rompen ulcerándose (Enríquez y col., 1989; Hiney y Olivier, 1999).

Clínicamente esta enfermedad se puede describir como una variedad de septicemia con hemorragias musculares y en otras zonas del cuerpo. La principal lesión que la caracteriza es una inflamación subcutánea que suele generar una dermatitis ulcerativa, afectando a las zonas musculares adyacentes. Histológicamente en casos muy avanzados se produce necrosis evidente de los tejidos, producto de enzimas proteolíticas extracelulares con abundantes colonias de bacterias Gram negativas. Internamente hay hemorragias petequiales en gónadas, tejido adiposo, peritoneo, hígado, riñón y bazo, acumulación de líquido en la cavidad abdominal, licuefacción de tejidos y renomegalia (McCarthy y Roberts, 1980; Roberts, 1981; Post, 1983; Austin y Austin, 1987; Bernoth, 1997).

3.5.4 Furunculosis intestinal

Una cuarta forma de Furunculosis asociada a baja mortalidad es la Furunculosis intestinal, debido a que es éste órgano el más alterado. Este normalmente se encuentra vacío, sin alimento, además, hay inflamación de la mucosa, hemorragia evidente y abundante cantidad de mucus. Se observa prolapso del ano y hemorragia en la zona de los ciegos pilóricos. Externamente hay restos de fecas y/o de mucus en el ano (Enríquez y col., 1989; Hiney y Olivier, 1999).

De las cuatro formas de presentación, solamente la primera tiene importancia, debido a que cuando se está frente a la forma asintomática, no se realiza aislamiento del agente (Enríquez y col., 1989).

Los síntomas que se observan son úlceras sangrantes y furúnculos en la región dorsal preferentemente, que pueden estar aislados o en grupos. Los peces se mueven lentamente y sin reflejos. Además, se producen rápidos movimientos de las agallas (taquibranchia), anorexia, letargia y “furúnculos” (Bernoth, 1997).

Con la excepción de los “furúnculos”, ninguno de los signos anteriores son específicos a la Furunculosis; los signos son comunes a muchas infecciones bacterianas sistémicas de los peces (Bernoth, 1997). Sólo en el caso de la forma crónica el diagnóstico clínico es suficiente para emitir un prediagnóstico adecuado. Sin embargo, en algunos casos de septicemia por *Aeromonas* móviles también es posible la presencia de abscesos similares en la superficie del cuerpo (Enríquez y col., 1989).

Las formas agudas de la enfermedad no son características de la Furunculosis, los signos asociados con la forma crónica, tomados conjuntamente con el origen y la historia de los peces, pueden ser de algún valor diagnóstico (Austin y Austin, 1999).

La muerte del pez se produce por un shock hipoglicémico debido a la utilización de la glucosa sanguínea por el patógeno en su proceso de multiplicación (Entrala, 1989; Austin y Austin, 1999; Hiney y Olivier, 1999).

3.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se basa tanto en los signos clínicos (Furunculosis crónica) como en el aislamiento y la identificación del organismo causal en el laboratorio. El aislamiento primario debe hacerse del riñón sobre un medio de cultivo adecuado (Agar TSA, o Müller–Hinton) a 20-25°C durante 24 a 48 horas para **A.s.s** y 7 a 14 días para **A.s.a** (Gudmundsdóttir, 1998; Enríquez y col., 1989).

El diagnóstico presuntivo de *Aeromonas salmonicida* incluye cuatro parámetros: morfología, tinción, motilidad y producción de pigmento. La aglutinación rápida en placa también es utilizada como un método rápido de detección (Post, 1983; Reinchenbach-Klinke, 1996).

El organismo, cuando se cultiva es un bacilo corto (cocoide), Gram negativo, inmóvil, citocromo oxidasa positivo. Aunque es bien reconocida la existencia de cepas acromogénicas, puede esperarse que la mayoría de las cepas produzcan un pigmento marrón cuando crecen en el medio de aislamiento (Amos, 1985; Roberts, 1989). Sin embargo, la habilidad de producir pigmento marrón puede ser inhibida por condiciones de pH y temperaturas extremas (Post, 1983).

El diagnóstico confirmativo de Furunculosis debería seguir al diagnóstico presuntivo. El diagnóstico serológico adquiere mayor importancia (Post, 1983). Actualmente se utilizan con muy buenos resultados las pruebas IFAT, ELISA y PCR, la alta especificidad y sensibilidad de ELISA hace que sea considerada como herramienta de elección para la detección de peces portadores o de peces enfermos asintomáticos (Enríquez y col., 1989).

Este trabajo constituirá uno de los primeros estudios en el país, cuyos objetivos son:

1. Reproducir la Furunculosis en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
2. Describir y comparar la Furunculosis producida por una cepa tipo (**A.s.s**) y por un aislado nacional (**A.s.a**) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
3. Comparar la relación existente entre la patogenicidad producida por **A.s.a** y **A.s.s** y el medio acuático en que son mantenidos los peces.

HIPÓTESIS: La inoculación de **A.s.s** y **A.s.a** provocará la “Furunculosis” en Salmones del Atlántico (*Salmo salar*), tanto en agua dulce como salada.

Además, permitirá dar a conocer la importancia tanto sanitaria como económica que posee esta enfermedad emergente para el sector salmonicultor, la que puede acarrear cuantiosas pérdidas en la industria salmonera. También se pretende entregar un mayor conocimiento de la enfermedad, para así efectuar de mejor manera las operaciones de manejo e ictiosanitarias de los centros de cultivo de peces.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 MATERIAL

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y los aislados bacterianos *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*, ésta, aislada en Chile y mantenidas en el laboratorio de Ictiopatología.

4.1.2 MATERIAL DE LABORATORIO

Para realizar este estudio se utilizó la implementación del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, lo cual permitió realizar siembras en placas, tinciones Gram, y microhematocrito. Para realizar el estudio histopatológico las muestras fueron enviadas al laboratorio de Anatomía Patológica del Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

4.1.3 MATERIAL DE SALA DE ACUARIOS

- 6 Acuarios de 80 l
- 6 Filtros de agua
- 6 Bombas de Aire
- 1 Sistema de termostato
- 6 Calefactores
- 6 Termómetros
- 3 Quechas
- Material de Aseo y desinfección
- Alimento
- Carbón activado y perlón

4.2 MÉTODO

4.2.1 OBTENCIÓN Y MANTENCIÓN DE LOS PECES

El experimento principal se realizó con 270 ejemplares de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un peso de 15-20 g, los cuales fueron obtenidos de una piscicultura sin antecedentes de Furunculosis, y trasladados al Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile en bidones plásticos, abastecidos en el trayecto con un sistema de aporte de oxígeno. Posteriormente los peces se depositaron en un estanque circular con agua dulce, con aireación

constante mediante bombas de aire con difusor, y filtros de perlón con carbón activado para su aclimatación y mantención por un período de una semana.

4.2.2 OBTENCION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Las bacterias de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*, que forman parte del cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile, fueron sembradas en Agar TSA y mantenidas a 20°C hasta lograr su crecimiento. De las colonias de las cepas bacterianas se realizó una suspensión bacteriana para ser inoculada intraperitonealmente a un grupo de 20 peces (*Salmo salar*).

El objetivo de realizar esta inoculación, es que a través del pasaje de estas cepas bacterianas en un grupo de peces se puede lograr la reactivación y además conocer su patogenicidad, debido a que investigaciones demuestran que la mantención prolongada de aislados de *Aeromonas salmonicida* en laboratorios, era frecuentemente responsable de una baja en su virulencia (Austin y Austin, 1999).

Una vez reactivadas ambas cepas bacterianas, fueron conservadas y mantenidas en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile, hasta el momento de ser utilizadas.

4.2.3 INOCULACIÓN

Previo al estudio experimental se realizó un chequeo sanitario a 60 peces según la O.I.E (2000) para confirmar que se trabajaría con peces exentos de cualquier agente infeccioso o parasitario que pudiera interferir en el resultado del estudio.

Una vez que los peces se encontraban aclimatados y se disponía del inóculo de ambas cepas bacterianas, se procedió a anestesiarse los peces con BZ 20^{®2}, por 3-5 minutos, para así lograr un manejo más fácil durante el proceso de inoculación.

Se inoculó intraperitonealmente con 0.1 ml de una solución bacteriana en solución fisiológica estéril, a una concentración de 10⁸ ufc/ml, determinado mediante densidad óptica a 600 nm, leído en un espectrofotómetro³ del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad

² Ethil P-Aminobenzoato. Lab. Veterquímica. Camino Melipilla #5641. Santiago-Chile.

³ Spectronic tipo Génesis 8.

Austral de Chile. Los dos grupos controles se inocularon con 0.1 ml de solución fisiológica estéril (0.85% NaCl). La densidad óptica para **A.s.a** fue de 0.94 y para **A.s.s** 1.04.

La concentración de 10^8 ufc/ml, además de ser determinada mediante espectrofotometría, fue confirmada posteriormente a través de recuento en placa. Para **A.s.a** la densidad óptica (D.O) fue de 0.94 con un promedio de 132 ufc en la dilución 10^{-7} , lo que corresponde a una concentración de $1,32 \times 10^9$ ufc/ml, equivalente a inocular $1,32 \times 10^8$ ufc/ml, debido a que solo se inyecta 0.1 ml de suspensión bacteriana. **A.s.s** tuvo una D.O de 1.16 con un promedio 159 ufc en el recuento en placa de la dilución 10^{-7} , lo que equivale a inocular 1.59×10^8 ufc/ml.

4.2.4 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

A medida que los peces fueron inoculados intraperitonealmente, eran distribuidos en 6 acuarios, cada uno con 35 peces, de acuerdo al siguiente diseño:

- 1 acuario con 35 peces para inoculación experimental de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC), en agua dulce.
- 1 acuario con 35 peces para inoculación experimental de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (ATCC), en agua salada.
- 1 acuario con 35 peces para inoculación experimental de *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* aislado nacional, en agua dulce.
- 1 acuario con 35 peces para inoculación experimental de *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* aislado nacional, en agua salada.
- 1 acuario con 35 peces como control, inoculados con solución fisiológica estéril (0.85% NaCl), en agua dulce.
- 1 acuario con 35 peces como control, inoculados con solución fisiológica estéril (0.85% NaCl), en agua salada.

Todos los peces recién inoculados fueron distribuidos en sus respectivos acuarios, en los cuales se dispuso de un sistema de filtro de carbón activado y perlón, además de aireación constante. Todos los peces del estudio se mantuvieron en un principio en agua dulce. A los peces desafiados con agua salada se realizó el recambio de agua dulce por agua salada en forma paulatina a partir del segundo día, cada vez con una proporción de recambio del 20% de agua salada, hasta reemplazar por ésta la totalidad del agua de los 3 acuarios, a una salinidad de 20‰.

Se reguló la temperatura (15-18°C) a partir del segundo día, mediante un sistema de termostato. Recibieron alimentación artificial a partir del cuarto día, la que fue de un 2% de su

peso corporal por día. Además, se controló diariamente la temperatura del agua y se registró la mortalidad diaria y acumulada.

4.2.5 PROCEDIMIENTO

4.2.5.1 ESTUDIO CLÍNICO

Cada pez muestreado fue examinado mediante inspección directa, describiendo macroscópicamente las alteraciones externas de piel, aletas, ojos y branquias, además de condición corporal y coloración de la piel.

4.2.5.2 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Finalizado el examen externo de los peces se procedió a realizar la necropsia de acuerdo al Fish Health Blue Book (Amos, 1985), y mediante una minuciosa observación de cada órgano de la cavidad abdominal (hígado, ciegos pilóricos, estómago, intestino, vejiga natatoria, vesícula biliar, grasa perivisceral y musculatura), se procedió a describir en forma macro y microscópicamente las alteraciones presentadas, para luego registrar individualmente la información.

4.2.5.3 ESTUDIO SANGUÍNEO

De cada acuario se tomó cinco peces al azar y se obtuvo sangre por punción de la vena caudal, la cual fue colectada en tubos de microhematocritos heparinizados y luego fueron centrifugados durante 5 minutos a 12.000 rpm, para posteriormente realizar la lectura de cada minitubo utilizando una tabla para obtener el porcentaje de volumen globular aglomerado (VGA) y el grosor de la capa flogística, considerando como peces anémicos a aquellos que presentaron un VGA <34 % (Stoskopf, 1992) y la capa flogística de los peces fue medida utilizando el rayado de la tabla de lectura de hematocrito obteniendo una apreciación indirecta del número de leucocitos totales, considerando un valor dado para animales domésticos en que una raya equivale aproximadamente a 8.000 leucocitos/ml.

4.2.5.4 SIEMBRA Y CULTIVO BACTERIANO

Se procedió a tomar muestras de bazo, hígado, riñón y musculatura, las que fueron sembradas mediante un asa estéril en placas con agar TSA y mantenidas en estufa para su incubación a una temperatura de 20°C hasta completar su crecimiento, para el posterior aislamiento de las bacterias. Produciéndose en el caso de **A.s.s** un pigmento marrón difuso, esto no ocurre para **A.s.a**. En el caso de **A.s.s** el crecimiento óptimo se alcanzaba el tercer o cuarto día y para **A.s.a** fue el quinto o sexto día.

Las colonias aisladas en las placas con agar TSA fueron sometidas al test de aglutinación rápida en placa⁴, para identificar la bacteria *Aeromonas salmonicida*.

4.2.5.5 TINCION DE GRAM

De cada ejemplar muestreado se realizaron improntas de tejido hepático, esplénico, renal hematopoyético y muscular sobre portaobjetos, los cuales fueron fijados con calor para posteriormente ser teñidos utilizando la tinción de Gram. Luego fueron observados al microscopio óptico con objetivo 100x con la finalidad de determinar en forma rápida la presencia de bacterias Gram negativas en dichos tejidos.

4.2.5.6 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Se tomaron muestras de hígado, riñón y bazo para análisis histopatológico (Anexo 2) de peces que clínicamente evidenciaban signología de Furunculosis, producto de la inoculación experimental con *Aeromonas salmonicida*. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10%, con posterioridad se laminaron en autotécnico con el propósito de deshidratar los tejidos en alcoholes, aclararlos en xilol e incluirlos en parafina, siendo cortados a 5 μm y finalmente, teñidos con Hematoxilina-Eosina.

⁴ Test “Mono-As by Bionor Skien-Norway”

5. RESULTADOS

5.1 MORTALIDADES

Las mortalidades de peces originadas producto de las inoculaciones experimentales con cepas bacterianas de *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida* (A.s.s) y *A. salmonicida subsp achromogenes* (A.s.a) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g de peso, se presentan a continuación en el cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Mortalidades diarias y acumuladas en *Salmo salar* (15-20 g), inoculados intraperitonealmente con *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* y *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, mantenidos en agua salada y dulce.

Días post inoculación	MORTALIDAD DIARIA Y ACUMULADA							
	<i>Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes</i>				<i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i>			
	Agua salada		Agua dulce		Agua salada		Agua dulce	
	Mort. diaria	Mort. acum (%)	Mort. diaria	Mort. acum (%)	Mort. diaria	Mort. acum (%)	Mort. diaria	Mort. acum (%)
1-4	–	–	–	–	–	–	–	–
5	–	–	–	–	4	11,4	1	2,9
6	–	–	2	5,7	8	34,2	3	11,4
7	3	8,5	5	20,0	6	51,4	3	20,0
8	17	57,7	11	51,4	7	71,4	9	45,7
9	12	91,4	6	68,6	4	82,9	6	62,9
10	3	100,0	3	77,1	–	–	4	74,3
11	–	–	2	82,9	–	–	–	–
12	–	–	2	88,6	–	–	–	–
13-31	–	–	–	–	–	–	–	–

- Ausencia de muertes

La mortalidad observada producto de la inoculación con A.s.a en agua salada alcanzó a 35 peces (100%), en cambio con A.s.s esta fue de 29 (82,9%) en el mismo medio. En el caso de peces inoculados con A.s.a y A.s.s en agua dulce las mortalidades alcanzaron las cifras de 31 (88,6%) y 26 (74,3%) peces respectivamente.

Cabe señalar que el mayor pick de mortalidad diaria en ambos grupos experimentales, tanto en agua dulce como salada, se detectó al 8^{vo} día post inoculación, siendo la excepción en los peces inoculados con A.s.s y mantenidos en agua salada, donde la mayor mortalidad diaria se observó el sexto día post inoculación, con posterioridad se visualizó una disminución de las mortalidades.

La mortalidad de **A.s.s**, tanto para agua salada como dulce, comenzó el quinto día y finalizó el noveno y décimo día post inoculación respectivamente. La mortalidad de **A.s.a** en agua salada se presentó concentrada en cuatro días (entre el séptimo y el décimo día post inoculación), mientras que la mortalidad de **A.s.a** en agua dulce comenzó un día antes (sexto día), prolongándose hasta el día doce post inoculación

El resultado de los peces muertos y de los peces sobrevivientes desafiados por las dos especies bacterianas y en ambos medios acuáticos se expresan en el siguiente gráfico.

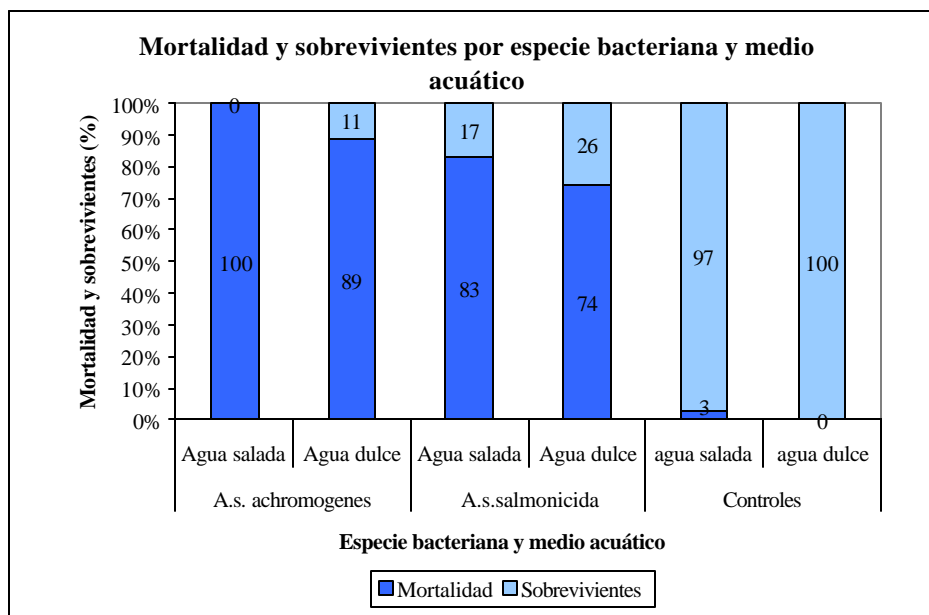


Gráfico N° 1. Mortalidades y sobrevivientes de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculados intraperitonealmente con A.s.a y A.s.s y mantenidos en agua dulce y salada.

Los acuarios controles de agua salada y dulce, presentaron un 97 y 100% de supervivencia respectivamente.

Se produjo la muerte de un pez en el acuario control de agua salada, no siendo la causa de muerte la bacteria *Aeromonas salmonicida*.

5.2 TINCIÓN DE GRAM

En la totalidad de las improntas realizadas, se observaron cocobacilos Gram negativos, siendo las bacterias más abundantes en los tejidos hematopoyéticos y muy escasos en las improntas de musculatura. Además en estos tejidos se observó un aumento de melanina y células melanomacrofágicas.

5.3 CULTIVO

En el cultivo de **A.s.a** en agar TSA, se observaron colonias pequeñas, circulares, solevantadas, translúcidas y blandas. En el caso de **A.s.s** las colonias se presentaron de un mayor tamaño y de color café-blanquecino. Su clasificación taxonómica se confirmó mediante el test de aglutinación rápida en placa con anticuerpos anti-*Aeromonas salmonicida*.

5.4 ESTUDIO HEMATOLOGICO

Los resultados obtenidos del estudio sanguíneo se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro N° 2. Valores de hematocrito y capa flogística en *Salmo salar* (15-20 g), inoculados intraperitonealmente con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y controles mantenidos en agua salada y dulce.

Muestras	<i>A. s. achromogenes</i>				<i>A. s. salmonicida</i>				Controles			
	Agua salada		Agua dulce		Agua salada		Agua dulce		Agua salada		Agua dulce	
	VGA (%)	Capa flogística	VGA (%)	Capa flogística	VGA (%)	Capa flogística	VGA (%)	Capa flogística	VGA (%)	Capa flogística	VGA (%)	Capa flogística
1	21,0	1	23,0	<1	27,0	1	34,0	<1	44,0	<1	44,0	<1
2	24,0	<2	27,0	1	25,0	1	32,0	<1	41,0	<1	46,0	<1
3	26,0	<1	25,0	<1	33,0	<1	30,0	<1	46,0	<1	46,0	<1
4	22,0	1	21,0	<2	25,0	<1	37,0	<1	43,0	<1	40,0	<1
5	24,0	<1	26,0	<1	31,0	<1	28,0	1	39,0	<1	45,0	<1
Promedio	23,4		24,4		28,2		32,2		42,6		44,2	

El hematocrito promedio de los cinco peces inoculados con **A.s.a** y mantenidos en agua salada y dulce fue de 23,4 y 24,4%, respectivamente, mientras que el VGA de los peces inoculados con **A.s.s** en los mismos medios fue de 28,2 y 32,2%, respectivamente. En los peces controles el VGA se mantuvo sobre el 40% lo cual es considerado normal para la especie y edad del pez. La capa flogística se mantuvo en general por debajo del 1%.

5.5 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

5.5.1 ASPECTOS MACROSCÓPICOS

El examen macroscópico de los peces desafiados con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (**A.s.a**) y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (**A.s.s**) en agua salada y dulce, fue realizado en forma dirigida, estudiándose aquellos que evidenciaban cambios de color, natación errática y letargia.

En los cuadros N° 2 y 3, se muestran las lesiones presentes con mayor frecuencia en los peces muestreados, frente a cada una de las bacterias inoculadas.

Cuadro N° 2. Aspectos lesionales externos presentes en *Salmo salar* (15-20 g), inoculados intraperitonealmente con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, mantenidos en agua salada y dulce.

Lesiones macroscópicas externas	Inoculación experimental												Total N= 140	
	<i>A. s. achromogenes</i>						<i>A. s. salmonicida</i>							
	agua salada n= 35		agua dulce n= 35		Total N= 70		agua salada n= 35		agua dulce n= 35		Total N= 70			
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Exoftalmia uni/bilateral	6	17,1	8	22,9	14	20,0	4	11,4	6	17,1	10	14,3	24	17,1
Palidez branquial	26	74,2	21	60,0	47	67,1	21	60,0	19	54,2	40	57,1	87	62,1
Hemorragia base de aletas	20	57,1	17	48,6	37	52,8	17	48,6	15	42,8	32	45,7	69	49,3
Hemorragia orificio anal	30	85,7	23	65,7	53	75,7	24	68,6	17	48,6	41	58,6	94	67,1
Descamación epidérmica	29	82,9	18	51,4	47	65,7	24	68,6	14	40,0	38	54,3	85	60,0
Oscurecimiento de la piel	35	100,0	31	88,5	66	94,2	26	74,2	24	68,5	50	71,4	116	82,9

Del análisis del presente cuadro, se desprende que el oscurecimiento de la piel (82,9%), seguido de las hemorragias anales (67,1%), constituyeron las principales lesiones observadas en ambos grupos inoculados, tanto en agua salada como dulce, otras lesiones evidenciaron presentación variable de acuerdo al tipo de agente inoculado y al medio en el cuál estaban presentes.

Cuadro N° 3. Alteraciones anatomopatológicas internas en el total de peces *Salmo salar* (15-20 g), inoculados intraperitonealmente con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, mantenidos en agua salada y dulce.

Lesiones macroscópicas internas	Inoculación experimental												Total N= 140	
	<i>A. s. achromogenes</i>						<i>A. s. salmonicida</i>							
	agua salada n= 35		agua dulce n= 35		Total N= 70		agua salada n= 35		agua dulce n= 35		Total N= 70			
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Renomegalia	31	88,6	29	82,9	60	85,7	24	68,6	25	71,4	49	70,0	109	77,9
Esplenomegalia	27	77,1	24	68,6	51	72,9	22	62,9	17	48,6	39	55,7	90	64,3
Enteritis	31	88,6	26	74,2	57	81,4	25	71,4	21	60,0	46	65,7	103	73,6
Petequias en vísceras	13	37,1	9	25,7	22	31,4	11	31,4	5	14,2	16	22,9	38	27,1
Ascitis sanguinolenta	33	94,3	26	74,2	59	84,2	27	77,1	24	68,6	51	72,9	110	78,6

De las alteraciones anatomopatológicas internas más frecuentes en el presente estudio se destaca la ascitis sanguinolenta (78,6%), seguido de la renomegalia (77,9%) y cuadros de enteritis (73,6%) en ambos grupos experimentales.

5.5.2 ASPECTOS MICROSCÓPICOS

En el cuadro N° 4, se presentan las alteraciones hepáticas observadas en *Salmo salar* (15-20 g), inoculados intraperitonealmente con **A.s.a** y **A.s.s**, mantenidos en agua salada y dulce.

Cuadro N° 4. Alteraciones microscópicas en hígados de *Salmo salar*, inoculados intraperitonealmente con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, mantenidos en agua salada y dulce.

Grupo	Casos N= 12	Tipos de trastornos										
		Necróticos		Degenerativos		Inflamatorios			Circulatorios	Del Crecimiento		
		Células (picnosis)	Focos	Deg. Vacuolar	Deg. Grasa	Linf.	Cond. biliares	Melano-macrofagos	Congestión	Pérdida estruct. cel.	Hipertrofia cél. Endoteliales	
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> n=6	Agua dulce n=3	1	+++	++	++	+	+	++	++	++	++	++
		2	+++	+	+	+	+	-	+	++	++	++
		3	+++	+	+	-	+	+	++	++	++	++
	Agua salada n=3	1	+++	++	+	+	+	+	+	++	+++	+++
		2	+++	+	+	-	+	-	+	++	++	++
		3	+++	++	++	-	+	-	++	++	+++	++
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> n=6	Agua dulce n=3	1	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
		2	+	++	+	-	+	-	+	++	++	++
		3	++	++	+	-	-	-	+	+	++	+
	Agua salada n=3	1	+	++	+	+	+	+	+	+	++	++
		2	++	++	+	-	+	-	+	+++	+	+
		3	++	++	+	-	+	+	++	++	+	++

-:	Ausente
+	Leve
++:	Moderada
+++:	Severa

Del presente cuadro, se desprende que las principales alteraciones microscópicas en hígado se observaron en el grupo de *Salmo salar* inoculados con **A.s.a**, la respuesta tisular se caracterizó por ser principalmente de moderada a severa.

Dentro de los tipos de alteraciones presentes, las más importantes son las Necróticas y las del Crecimiento, seguido de los Trastornos Circulatorios. Los procesos más leves lo constituyen los cuadros Inflamatorios y finalmente los procesos Degenerativos.

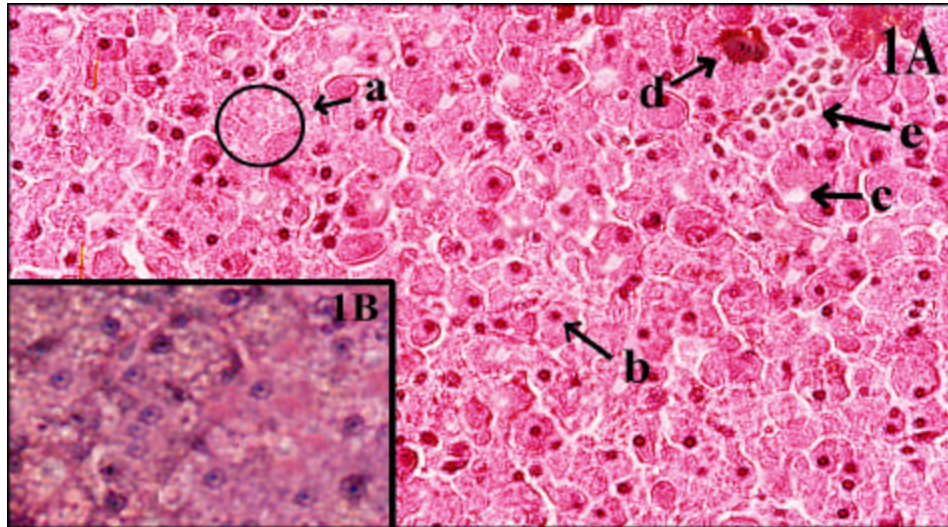


FIGURA 1. (1A) Hígado de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado i.p con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (A.s.a) y mantenido en agua salada. (a) áreas de necrosis de coagulación, (b) picnosis, (c) vacuolización, (d) melanomacrófagos, (e) congestión. H/E 200x. (1B) Hígado tejido normal.

A continuación se presentan las alteraciones en riñones de *Salmo salar*, inoculados intraperitonealmente con **A.s.a** y **A.s.s**, mantenidos en agua salada y dulce.

Cuadro N° 5. Alteraciones en riñones de *Salmo salar* (15-20 g), inoculados intraperitonealmente con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, mantenidos en agua salada y dulce.

Grupos		Casos N= 12	TIPOS DE TRASTORNOS						
			Necróticos	Degenerativos	Inflamatorios			Del Crecimiento	
			Células (Picnosis)	Vacuolización	Linf.	Linfoblastos	Edema	Pérdida ordenamiento cél.	Separación cel. de membrana basal
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> n=6	Agua dulce n=3	1	++	+	++	+	+	+	++
		2	+++	++	++	++	++	++	++
		3	+	+	+	+	+	++	
	Agua salada n=3	1	+++	++	+++	++	++	+++	+++
		2	++	++	++	++	+	+++	++
		3	+++	++	+++	++	++	++	++
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> n=6	Agua dulce n=3	1	+	+	+	+	+	+	
		2	++	+	++	++		++	+
		3	+	++	+	++	++	+	++
	Agua salada n=3	1	++	+	+	++	++	++	++
		2	+++	++	++	++	+	+++	+++
		3	++	+	+	++	+	++	+++

-: Ausente
 +: Leve
 ++: Moderada
 +++: Severa

La observación del cuadro N° 5 demuestra que no hubo trastornos anatomopatológicos diferentes a los visualizados en hígado, existiendo coincidencia en general, en cuanto a los tipos de alteraciones anatomopatológicas, siendo prioritarios los procesos necróticos y del crecimiento, seguido sin grandes diferencias por las alteraciones inflamatorias.

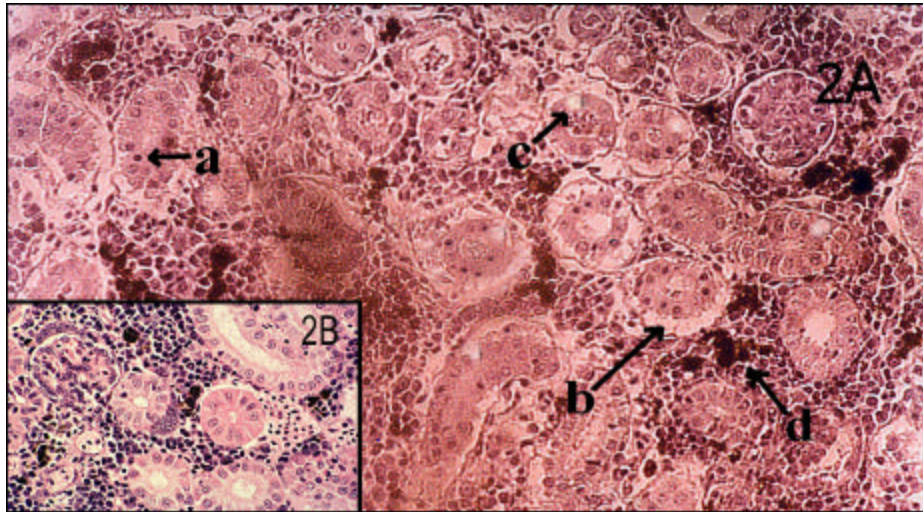


FIGURA 2. (2A) Riñón de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado i.p con *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (A.s.s) y mantenido en agua salada. (a) picnosis, (b) separación celular de la membrana basal, (c) vacuolización, (d) melanomacrófagos. H/E 200x.
(2B) Riñón tejido normal

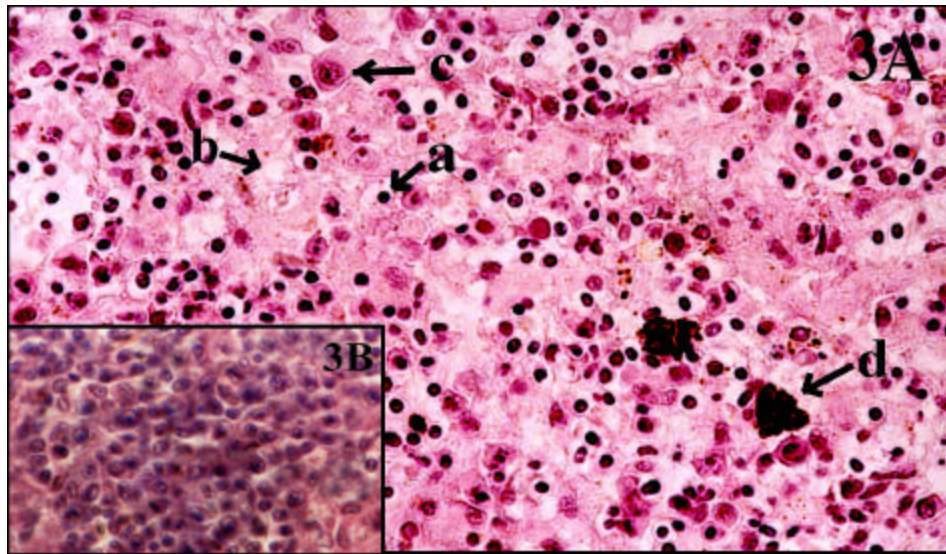
En el cuadro N° 6 se presentan las alteraciones presentes en bazos de *Salmo salar*, inoculados intraperitonealmente con **A.s.a** y **A.s.s**, mantenidos en agua salada y dulce.

Cuadro N° 6. Alteraciones microscópicas en bazos de *Salmo salar* (15-20 g), inoculados intraperitonealmente con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, mantenidos en agua salada y dulce.

Grupos		Casos N= 12	TIPOS DE TRASTORNOS					
			Necróticos		Inflamatorios		Circulatorios	Del Crecimiento
			Células (Picnosis)	Cariorexis	Linf.	Linfoblastos	Congestión	Hiperplasia
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	Agua dulce n=3	1	+		+	+	+	+
		2	++	+	++	++	+	++
		3	++	+	++	+	++	+
	Agua salada n=3	1	+++	++	++	++	++	+++
		2	++	+	++	++	++	++
		3	++	+	+	++	+	++
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Agua dulce n=3	1	+		+	+		+
		2	++	+	+	++	+	+
		3	++	+	++	++	+	++
	Agua salada n=3	1	++	++	++	++	+	++
		2	+++	++	++	++	++	+++
		3	++	++	++	++	+++	+++

-:	Ausente
+	Leve
++:	Moderada
+++:	Severa

En relación a los tipos de trastornos presentes en el bazo, estos corresponden a los mismos descritos para hígado y riñón. De las alteraciones mencionadas los trastornos necróticos (picnosis) junto a los procesos inflamatorios son los más importantes, seguido de los trastornos del crecimiento y finalmente circulatorios.



**FIGURA 3. (3A) Bazo de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado ip con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (A.s.a) y mantenido en agua dulce. (a) picnosis, (b) vacuolización, (c) linfoblasto, (d) melanomacrófago. H/E 200x.
(3B) Bazo tejido normal.**

6. DISCUSIÓN

En los últimos años la industria salmonera ha dado muestras de crecimiento sostenido en nuestro país, sin embargo, la presencia de enfermedades en los peces ha limitado este crecimiento, influyendo negativamente en el proceso productivo. Entre estas enfermedades se encuentra la Furunculosis, ocasionando pérdidas en la industria salmonera mundial, con mortalidades que fluctúan entre 30 a 80% de los peces (Trust, 1986). Esta mortalidad se atribuye a una masiva bacteremia con necrosis de tejidos, producto de las toxinas que libera la bacteria, además de shock hipoglicémico que produce el agente debido a la utilización de la glucosa sanguínea en el pez infectado (Entrala, 1989).

Si bien, no siempre es fácil evaluar objetivamente los daños causados por las enfermedades virales y parasitarias, a pesar de su relativa especificidad o la influencia de las condiciones de explotación intensiva, el problema es todavía más complicado cuando se trata de las bacteriosis, debido a que estas últimas son raramente específicas en especies salvajes o criadas en condiciones extensivas, pasando de este modo desapercibidas durante mucho tiempo (De Kinkelin y col., 1985).

Muchos aspectos del patógeno, demandan una atención adicional para poder revelar sus complejidades. Aunque se han realizado esfuerzos substanciales para lograr una comprensión del ciclo natural de la enfermedad en el medio ambiente, todavía sigue siendo un problema resolverlo. Las informaciones existentes son parciales y a menudo contradictorias (Austin y Austin, 1999).

Diferentes estudios concuerdan en señalar que *Aeromonas salmonicida* es patógena para salmonídeos y no salmonídeos. En los primeros produce la Furunculosis y en los no salmonídeos (principalmente Cyprínidos) la "Eritrodermatitis". Dentro de los salmonídeos, la mayor susceptibilidad está dada por el salmón del atlántico y la trucha arcoiris (Enríquez y col., 1989).

El estudio de la enfermedad, tanto en agua dulce como salada es de vital importancia, ya que un aspecto importante en la epizootiología de la enfermedad es verificar la transmisión en el agua de mar. Este es un importante tópico en la industria acuícola, ya que se ha pensado que existe la posibilidad que la enfermedad sea transportada por salmones infectados previamente a su fase de agua dulce (Austin y Austin, 1987).

Cabe mencionar que este trabajo fue realizado sin contar previamente con el cálculo de la dosis letal media (D_{50}) para estas bacterias, por lo tanto, la suspensión bacteriana usada a una concentración de 10^8 ufc/pez es elevada, lo que explicaría las altas mortalidades consecuentes, pero a su vez esto permite entregar mayor información, por cuanto facilita su estudio y comparación de ambas cepas bacterianas y su interrelación con el medio acuático y la especie de pez inoculada.

Aún cuando *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ha sido probablemente el patógeno de los peces más estudiado, solo recientemente han cobrado importancia las cepas atípicas, esto debido a que en la última década, aislados atípicos de *Aeromonas salmonicida* se han vuelto una preocupación creciente en varios países, ya que ha sido asociada con altas mortalidades tanto en especies salmonídeas como no salmonídeas (Gudmundsdóttir, 1998; Hiney y Olivier, 1999).

Pickering (1997), menciona que las cepas atípicas de *Aeromonas salmonicida* son capaces de producir la Furunculosis en los peces, sin embargo, estas cepas poseen menor patogenicidad que *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. La patogénesis de la Furunculosis es un fenómeno multifactorial en el que la severidad de los signos clínicos es dependiente tanto de factores predisponentes endógenos (huésped) como exógenos (ambiente y manejo sanitario). Estos factores predisponentes contribuyen a la aparición de la enfermedad debido a una disminución de los mecanismos de defensa del huésped, incrementando la susceptibilidad a la infección y a la Furunculosis clínica.

En este trabajo, la relación entre mortalidad producida según el medio acuático en que fueron mantenidos los peces, muestra que las mayores mortalidades se produjeron en los peces inoculados con **A.s.a** y mantenidas en agua salada (100%), seguido en orden decreciente: **A.s.a** en agua dulce (88,6%), **A.s.s** en agua salada (82,9%) y **A.s.s** en agua dulce (74,3%). Sin embargo, Hiney y col. (1999) describen que las cepas atípicas de *Aeromonas salmonicida*, generalmente solo producen ulceración cutánea, no obstante, la infección no necesariamente es sistémica y la muerte del pez no siempre se produce. Además proporciona evidencia que demuestra que los aislados atípicos podrían no solo ser patógenos para su hospedador, sino que también para otras especies.

Las mortalidades en este estudio fueron relativamente mayores en los peces inoculados con **A.s.a**, sin embargo, la mortalidad producida en los peces inoculados con **A.s.s** tuvo un comienzo anterior, esto tendría concordancia con lo propuesto por Pickering (1997), en relación a la patogenicidad de **A.s.s**.

Es importante mencionar que la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (**A.s.s**) es una bacteria que no se ha aislado en el país, mientras que *Aeromonas salmonicida*

subsp. *achromogenes* (A.s.a) es una cepa recientemente aislada en Chile*. Una causa de la menor patogenicidad lograda por la bacteria **A.s.s**, puede ser que ésta se ha mantenido por años almacenada en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile. Esto es corroborado por Austin y Austin (1987), quienes mencionan que el almacenamiento y crecimiento en medios artificiales, además de la mantención prolongada de *Aeromonas salmonicida* en laboratorio, se traduce en una menor patogenicidad. Para disminuir este efecto, además de mantener o incrementar la virulencia de la bacteria, se hicieron dos pasajes seguidos en salmón del atlántico (*Salmo salar*), inoculándose intraperitonealmente 10 peces (15-20 g) con una solución bacteriana de al menos 10^8 bacterias/ml, medido por apreciación visual, utilizando para ello los estándares de turbidez de Mc Farland (5 Mc Farland).

Estos datos muestran que independientemente de la bacteria usada para inocular los salmones, es en los peces mantenidos en agua salada donde se produce una mayor mortalidad. En este sentido Roberts y Shepherd (1997), demuestran que el agua salada posee mayores ventajas que el agua dulce para el cultivo de salmonídeos, ya que esta es generalmente más estable en cuanto a temperatura, física y químicamente, a diferencia del agua dulce. Sin embargo, el período más crítico para los salmonídeos es durante su aclimatación al agua salada, debido a que se encuentran bajo un estado de estrés fisiológico, por lo que requieren de un mayor control en los niveles de sal en la sangre, además de sufrir cambios hormonales alrededor de este período, llevando incluso a la incapacidad de adaptarse al nuevo ambiente. Esto podría ser explicado debido a que cuando los salmones son traspasados al agua de mar, estos necesitan aumentar la excreción de los altos niveles de sal que se producen. Este problema fisiológico tiene importantes implicaciones para el cultivo de salmones debido a que cualquier excreción de sal rápida, provoca una deshidratación y pérdida de escamas, esto predispone a los peces a posibles infecciones (Roberts y Shepherd, 1997). Esto confirma la mayor descamación en los peces mantenidos en agua salada que aquellos mantenidos en agua dulce observada en este estudio.

Inglis y col. (1993), señalan que en muchos aspectos el desarrollo de la enfermedad clínica en los peces en fase de agua dulce, es muy similar a la producida en los de fase marina. Sin embargo, cuando las poblaciones expuestas son más adultas, el curso de la enfermedad tiende a ser más crónico, aunque, no obstante el curso será fatal.

De Kinkelin y col. (1985), señalan que las enfermedades bacterianas de los peces se manifiestan por signos clínicos poco específicos. Dentro de los aspectos lesionales, las septicemias microbianas con dominante necrosis-hemorragia son las más frecuentes y las más espectaculares, son provocadas principalmente por bacilos Gram negativos. Bajo esta forma se manifiestan las mayores pérdidas en los centros de cultivo. La infección evoluciona siempre en dos etapas de importancia relativa muy variable. Primero se produce una fase de

* Comunicación personal Dr. Ricardo Enríquez S., Laboratorio de Ictiopatología, Instituto de Patología Animal, U.A.CH. (2002).

multiplicación local que se desarrolla en el lugar inicial de infección, seguido de una fase de invasión del organismo (septicemia) que tiene como resultado la expresión típica de la enfermedad.

En el estudio sanguíneo se determinaron los valores de hematocrito y capa flogística de cinco peces de cada unidad experimental, observándose que el VGA de los peces inoculados con **A.s.a** fue menor que en aquellos inoculados con **A.s.s**, a su vez el VGA fue menor en los peces mantenidos en agua salada en comparación con que aquellos mantenidos en agua dulce. Estos valores muestran que existe anemia. Stoskopf (1992), indica que el valor de referencia del hematocrito se encuentra entre 32 y 45%, confirmado por el VGA de los acuarios controles que se encontraba dentro de estos valores referenciales.

Austin y Austin (1999), señalan que las enfermedades microbianas están caracterizadas por anemia, la que puede resultar a su vez de las extravasaciones sanguíneas y de la destrucción del riñón hematopoyético. En este caso la anemia se traduce en una disminución del hematocrito. Según las circunstancias, se le asociará una leucopenia o, en los primeros momentos de la infección, una leucocitosis (De Kinkelin y col., 1985). Como consecuencia de la anemia, se produce un mecanismo de compensación en la producción de glóbulos rojos. Por este motivo aparecen células inmaduras en la sangre circulante, el bazo se encuentra frecuentemente aumentado de tamaño y los centros melanomacrófagos conteniendo grandes depósitos de hemosiderina (Roberts, 1989).

Los resultados obtenidos en el presente estudio señalan que, tanto los peces inoculados con **A.s.a** como aquéllos inoculados con **A.s.s**, presentaron signología clínica de Furunculosis.

Las lesiones macroscópicas externas más relevantes observadas tanto en los peces inoculados con **A.s.a** como en aquellos inoculados con **A.s.s** fueron el oscurecimiento de la piel (82,9%), hemorragia del orificio anal (67,1%), palidez branquial (62,1%), descamación (60,0%). También se apreciaron otras lesiones en menor grado como: hemorragia en la base de las aletas pares (49,3%) y exoftalmia uni/bilateral (17,1%), lesiones descritas por numerosos autores (Inglis y col., 1993; Bernoth, 1997; Gudmundsdóttir, 1998; Austin y Austin, 1999; Hiney y col., 1999).

Al comparar las lesiones macroscópicas externas en ambos grupos inoculados, se observó que la inoculación con **A.s.a** originó un porcentaje mayor de patologías en cada uno de los aspectos evaluados. Finalmente se puede señalar que en relación al medio, los peces en agua salada en ambos grupos evidenciaron un mayor compromiso lesional

En relación a las lesiones macroscópicas internas observadas en los peces inoculados con **A.s.a** y **A.s.s**, se observó ascítis sanguinolenta (78,6%), renomegalia (77,9%), enteritis (73,6%), esplenomegalia (64,3%) y hemorragias petequiales en vísceras (27,1%). El grado lesional más severo se observó en los peces inoculados experimentalmente con **A.s.a**, lo cual es concordante con las lesiones macroscópicas externas, las que se observaron en mayor porcentaje en el mismo grupo experimental. De igual forma, se puede señalar que al comparar ambos grupos experimentales en relación al medio en que fueron mantenidos, se visualizó un mayor grado lesional en los peces mantenidos en agua salada. Al igual que las lesiones macroscópicas externas anteriormente mencionadas, las lesiones macroscópicas internas son ampliamente descritas por diversos autores (Inglis y col., 1993; Bernoth, 1997; Gudmundsdóttir, 1998; Austin y Austin, 1999; Hiney y col., 1999).

Al realizar la necropsia es frecuente observar como se derrama un líquido ascítico, resultado de la acumulación ligada al mal funcionamiento circulatorio y renal. Este líquido seroso y amarillento en su forma inicial, puede tomar un aspecto fibrinoso y hemorrágico si las rupturas capilares son importantes. Las lesiones necróticas evolucionan a menudo en pequeños focos o en el tejido intersticial de los órganos hematopoyéticos (riñón, bazo, hígado), de forma que difícilmente son observables a simple vista. En las formas avanzadas, sin embargo, el reblandecimiento, incluso la casi licuefacción de los órganos es el signo más notorio (De Kinkelin y col., 1985).

La Furunculosis al ser una enfermedad septicémica con carácter necro-hemorrágico, evoluciona a partir de un foco de penetración o de activación microbiana, tendiendo a la diseminación por vía sanguínea hacia los focos de infección secundarios. Se estimulan las funciones fagocitarias y las lesiones histológicas observadas poseen un doble origen: una acción directa de la bacteria, y la reacción del hospedador, quién para controlar la infección, pone en juego una gran cantidad de mecanismos, a veces severos, constituyendo la inflamación aguda (De Kinkelin y col., 1985).

En cuanto a la histopatología de la Furunculosis, esta ha sido descrita por McCarthy y Roberts (1980), Roberts (1981) y Bernoth (1997), en donde se describen diferentes grados de necrosis en los tejidos, congestión de vasos y capilares, incremento de células linfocitarias, melanomacrófagos, gránulos de melanina, aumento del tamaño de las células reticulares, focos bacterianos en varios órganos, corroborándose con ello los aspectos lesionales observados en los peces inoculados en este estudio.

Plumb (1999) menciona que los cambios histopatológicos son similares a los observados en los peces naturalmente infectados, siendo los órganos hematopoyéticos los principalmente afectados.

Roberts, (1981), describe que en el examen histopatológico de los peces se produce una necrosis tóxica cardíaca, especialmente en el revestimiento auricular y la presencia de pequeños focos bacterianos en el miocardio, tejido hematopoyético y branquias, lo que provocaría la notoria congestión leve a severa producida en los órganos. Igualmente el mismo autor describe necrosis de coagulación en el tejido hepático como consecuencia de una isquemia o falta de riego sanguíneo en un área determinada, además observa una marcada picnosis, en la cual hay condensación de la masa celular y una intensa coloración, además, los centros melanomacrofágicos se encuentran aumentados, si bien es cierto estos pueden observarse en el tejido hematopoyético (stroma esplénico, intersticios renales y en menor proporción en espacios periportales hepáticos, submucosa intestinal y en el timo) de los teleosteos, pero no en los vertebrados superiores. La degeneración micro y macrovacuolar difusa en las áreas más afectadas son el resultado de una reacción inflamatoria grave, en donde el citoplasma de la célula es desplazado por vacuolas. Siendo esta descripción concordante con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Los cambios histopatológicos observados en las muestras de hígado señalan una pérdida de la estructura arquitectónica, áreas de necrosis de coagulación con picnosis, congestión (vena centrolobulillar), células endoteliales aumentadas de tamaño, células linfocitarias en focos alrededor de conductos biliares y degeneración micro y macrovacuolar. Estas lesiones se visualizaron en peces inoculados tanto con **A.s.a** como con **A.s.s**. En ambos grupos experimentales la intensidad de los procesos fue de leve a moderada. Sin embargo, hubo una mayor severidad lesional en peces inoculados con **A.s.a**, no observándose diferencias entre agua salada y dulce. Al comparar las lesiones entre ambos grupos inoculados, los trastornos necróticos fueron de mayor severidad, tanto en agua salada como dulce en peces inoculados con **A.s.a**. (Cuadro N° 4).

A nivel renal las lesiones histopatológicas observadas más frecuentemente fueron los trastornos necróticos y del crecimiento. Los trastornos degenerativos e inflamatorios se presentaron con igual frecuencia pero su severidad fue menor. De los trastornos degenerativos diagnosticados a nivel renal, la degeneración vacuolar constituyó el trastorno más significativo, observándose en la totalidad de las muestras analizadas. En relación a los trastornos del crecimiento se observó pérdida del ordenamiento celular y separación celular de la membrana basal. En cuanto a los trastornos inflamatorios se observó incremento de linfocitos y linfoblastos, además de un leve a moderado grado de edema (Cuadro N° 5).

En general, los trastornos anatomopatológicos del riñón son similares a los producidos en el hígado en cuanto a los tipos de alteraciones presentes, siendo prioritarios los procesos necróticos y del crecimiento, seguido sin grandes diferencias por las alteraciones inflamatorias, en que a diferencia del hígado si constituyen una respuesta importante por parte del tejido. Las alteraciones degenerativas son las menos significativas. Cabe resaltar que en general la mayoría de las afecciones están de acuerdo a la graduación propuesta entre moderada y severa. Por otra parte, cabe señalar que se visualiza un mayor grado lesional en

ambos grupos inoculados en agua salada, siendo estos principalmente entre moderados a severos.

En el tejido esplénico se observa que el trastorno necrótico celular más frecuente lo constituyó la picnosis, en cambio, la cariorrexis se observó con menor frecuencia. El trastorno del crecimiento de mayor presentación fue la hiperplasia de las células reticulares, sin embargo también se logró apreciar una leve hiperplasia de las células melanomacrofágicas. La alteración circulatoria más importante fue la congestión. También se observó reacción inflamatoria leve a moderada. Estos aspectos lesionales microscópicos del bazo fueron observados casi en la totalidad de las muestras analizadas. Al comparar entre ambos grupos inoculados destaca que en ambos casos las lesiones más severas están en los peces mantenidos en agua salada, siendo las lesiones principalmente de carácter moderado a severo (Cuadro N° 6).

A nivel intestinal se observó necrosis leve, congestión y reacción inflamatoria leve a moderada en la totalidad de las muestras analizadas.

Roberts, (1981) señala que las septicemias causadas por organismos Gram negativos pueden resultar en la localización de colonias del microorganismo dentro de los tejidos hematopoyéticos, provocando que toxinas circundantes provenientes de otras lesiones provoquen una necrosis *in situ* del tejido hematopoyético renal y esplénico. En el caso de *Aeromonas salmonicida* pueden también encontrarse fuera de estos tejidos, resultando en una respuesta celular inflamatoria (Roberts, 1989).

Cuando la infección se generaliza, los órganos intervenidos son colonizados, encontrándose: necrosis, congestión, hemorragias y migración celular, en diversos grados. Al parecer la fagocitosis no es intensa en el torrente circulatorio, y será en los órganos ricos en células endoteliales especializadas en esta función, hacia donde las bacterias serán masivamente movilizadas. Ocurre así para el corazón, el riñón, el hígado y el bazo. Esto explica las hepatitis, esplenitis y endocarditis focales o difusas producidas en la Furunculosis. El tejido intersticial del riñón, es el que sufre en principio los primeros ataques, aunque los nefrones pueden estar afectados por la extensión de las lesiones, y las glomerulonefritis no son raras (De Kinkelin y col., 1985).

7. CONCLUSIONES

- Del presente estudio, se concluye que *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (**A.s.a**) y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (**A.s.s**), inoculadas intraperitonealmente en peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g, permitieron la reproducción del cuadro de Furunculosis, con su típica presentación clínica y aspectos lesionales.
- Las mayores mortalidades fueron las producidas en el grupo inoculado con **A.s.a** y mantenidos en agua salada (100%), luego en orden decreciente se encuentra la mortalidad de **A.s.a** en agua dulce (89%), peces inoculados con **A.s.s** en agua salada (83%) y finalmente los peces inoculados con **A.s.s** mantenidos en agua dulce (74%).
- Los resultados obtenidos del estudio sanguíneo muestran que en los peces inoculados con **A.s.a** y mantenidos en agua salada se produce un grado mayor de anemia.
- Se producen mayores alteraciones anatomopatológicas externas e internas en los peces desafiados en agua salada que en los de agua dulce, y entre estos los peces más afectados son aquellos inoculados con *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (**A.s.a**).
- Desde el punto de vista microscópico, en los tres órganos estudiados (hígado, riñón y bazo), se detectaron idéntico tipo de trastornos histopatológicos, siendo los procesos necróticos, junto a los trastornos del crecimiento los predominantes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AMOS, K.** 1985. Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. Fish Health Section. American Fisheries Society. Third Edition. pp: 38-40.
- AUSTIN & AUSTIN.** 1987. Bacterial Fish Pathogens; Diseases in Farmed and Wild Fish. Ed. Ellis Horwood Limited. Chichester. U.K. Chapter 9, p: 111-173.
- AUSTIN & AUSTIN.** 1999. Bacterial Fish Pathogens; Disease of Farmed and Wild Fish. Ed. Praxis Publishing Ltd. Chichester. U.K. Third edition. p: 63-79.
- BELLAND, R.; T.J. TRUST.** 1988. *Aeromonas salmonicida* plasmids. En: Inglis, V; R. Roberts; N. Bromage. 1993. Bacterial Diseases of Fish. Institute of Aquaculture. Chapter 7. p: 122-141
- BERNETH, E.M.** 1997. Furunculosis. Multidisciplinary Fish Disease Research. Ed. Academic Press. pp: 847.
- BRAVO, S.** 1999. Atypical Furunculosis in Atlantic Salmon Raised in Chile. **Rev. Fish Health Newsletter.** 27: 2.
- DE KINKELIN, P.; CH. MICHEL; P. GHITTINO.** 1985. Tratado de las enfermedades de los peces. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp: 353.
- DEL VALLE, A. E.** 1992. Fish Health Blue Book. Procedimientos para la detección de ciertos patógenos de los peces. American Fisheries Society. Fish Health Section. p: 42-44.
- ENRÍQUEZ R.; W. SHAFER; V. ALVARADO; M. MONRAS.** 1989. Enfermedades bacterianas en peces y sus técnicas diagnósticas. En: Curso de postgrado. Facultad Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. p: 10-32.

- EMMERICH R.; E. WEIBAL.** 1894. Über eine durch Bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen. En: McCarthy, D.H; R.J. Roberts. 1980. Furunculosis of fish. The present state of our knowledge. *Advances in Aquatic Microbiology*. Ed. M.R. Droop and H.W.Jannasch, Academic Press, London, p: 293–341.
- ENTRALA, P.** 1989. Investigación de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophila* en salmonídeos provenientes de pisciculturas de agua dulce de la provincia de Llanquihue (Décima Región) Chile. Tesis, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- GUDMUNDSÓTTIR, B.K.** 1998. Infections by atypical strains of the bacterium *Aeromonas salmonicida*. *Rev. Icel. Agr. Sci.* **12**: 61-72.
- HEEN, H; R.L. MONAHAN; F. UTTER.** 1993. Salmon Aquaculture. Ed. Halsted Press. Chapter 7. Salmon Disease. p: 166-186.
- HINEY, M; G. OLIVIER.** 1999. Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). Fish Diseases and Disorders, Vol. 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Ed. P.T.K. Woo and D.W. Bruno. p: 341-401.
- HOLT, J.G; N.R. KRIEG; P.H. SNEATH; J.T. STALEY; S.T. WILLIAMS.** 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Ed. Williams & Wilkins. p: 190-191.
- INGLIS, V; R. ROBERTS; N. BROMAGE.** 1993. Bacterial Diseases of Fish. Institute of Aquaculture. Chapter 7. p: 122-141.
- KITAO, T; T. YOSHIDA; T. AOKI; M. FUKUDOME.** 1984. Atypical *Aeromonas salmonicida*, the Causative Agent of an Ulcer Disease of Eel Occurred in Kagoshima Prefecture. *Rev. Fish Pathology.* **19**: 113-117.
- LAILER, L.A; J.W TREASURER; A.N. GRANT and D.I. COX.** 1999. Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in wrasse (Labridae) used as cleaner fish of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Rev. Journal of Fish Diseases.* **22**: 209-213.

- LOZANO, M.L.** 2000. Compendio y Directorio de la Acuicultura y la Pesca de Chile 2000. Ed. Fundación Chile. p: 19-58.
- McCARTHY, D.H; R.J. ROBERTS.** 1980. Furunculosis of fish. The present state of our knowledge. *Advances in Aquatic Microbiology*. Ed. M.R. Droop and H.W.Jannasch, Academic Press, London, p: 293–341.
- MÉNDEZ, R; C. MUNITA.** 1989. La salmonicultura en Chile. Ed. Fundación Chile. p: 37-69.
- O'BRIEN, D; J. MOONEY; D. RYAN; E. POWELL; M. HINEY; P. SMITH; R. POWELL.** 1994. Detection of *Aeromonas salmonicida*, Causal Agent of Furunculosis in Salmonid Fish, from the Tank Effluent of Hatchery-Reared Atlantic Salmon Smolts. *Rev. Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 3874-3877.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIA (O.I.E).** 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Third ed. Paris. Francia
- PATERSON, W.D; D. DOUEY;D. DESAUTELS.** 1980. Isolation and Identification of an Atypical *Aeromonas salmonicida* Strain Causing Epizootic Losses Among Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Reared in a Nova Hatchery. *Rev. Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**: 2236-2240.
- PICKERING, A.D.** 1997. Husbandry and stress. En: *Furunculosis, Multidisciplinary Fish Disease Research* eds. E. Bernoth, A.E. Ellis, P.J. Midtlyng, G. Olivier, y P. Smith, Academic Press, London, pp: 178–202.
- PLUMB, J.A.** 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Ed. Iowa State University Press. pp: 230-235.
- POPOFF. M.** 1984. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Ed. Williams y Wilkins. Baltimore/London. p: 545-548.
- POST, G.** 1983. *Textbook of Fish Health*. Ed. T.F.H. Publication Inc. Ltd. Neptune City. New Jersey. p: 25-28.

REINCHENBACH-KLINKE, H. 1996. Claves para el diagnóstico de las enfermedades de los peces. Ed. Acribia. Zaragoza. España. pp: 89.

ROBERTS, R.J; C.J. SHEPERD. 1980. Enfermedades de la Trucha y del Salmón. Ed. Acribia. Zaragoza. España. p: 73-74,110-114.

ROBERTS, R.J. 1981. Patología de los Peces. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. pp: 333.

ROBERTS, R.J. 1989. Fish Pathology. 2ª Edición. Ed. Bailliere Tindall. W.B Saunders. London. UK. p: 307-311.

STOSKOPF, M.K. 1992. Fish medicine. Ed. W. B. Saunders Company. p: 274-275, 364-366.

TRUST, T.J. 1986. Pathogenesis of infections diseases of fish. **Rev. Ann. Microbiol. 40:** 479-502.

9. ANEXOS

Anexo 1. Características y propiedades bioquímicas para la diferenciación entre *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*.

Propiedades	<i>Aeromonas salmonicida</i>	
	<i>salmonicida</i>	<i>achromogenes</i>
Motilidad		
Crecimiento a 37°C		
Producción de:		
Pigmento café	+	
Indol		+
Oxidasa	+	+
Sacarosa		+
Gas de glucosa	+	
H ₂ S		
Degradación de:		
Sangre	+	
Esculina	+	
Resistencia a:		
Ampicilina 33 µg (CMI)	S	R
Cefalotina 66 µg (CMI)	S	R

+, reacción positiva (80%); , reacción negativa (20%); R, resistente; S, sensible. Datos obtenidos por diferentes laboratorios, métodos y tiempos de incubación (de 2 a 14 días a 20-25 °C).

Fuente: Paterson y col., 1980; Kitao y col., 1984; Manual Bergey's of Systematic Bacteriology, 1984; Enríquez y col., 1989; Gudmundsdóttir, 1998; Austin y Austin, 1999.

Anexo 2 Días en que se obtuvieron las muestras de órganos (Hígado, riñón, bazo e intestino), obtenidas de peces Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculados con *Aeromonas salmonicida* (subsp. *achromogenes* y subsp. *salmonicida*) y analizadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Universidad Austral de Chile.

Peces	Muestras / Días post inoculación									
	1-4	5	6	7	8	9	10	11	12	13-31
Grupo 1				1°		2°	3°			
Grupo 2			1°		2°				3°	
Grupo 3		1°		2°		3°				
Grupo 4		1°			2°		3°			
Grupo 5										1
Grupo 6										1

- Grupo 1: Peces inoculados con **A.s.a** y mantenidos en agua salada.
- Grupo 2: Peces inoculados con **A.s.a** y mantenidos en agua dulce.
- Grupo 3: Peces inoculados con **A.s.s** y mantenidos en agua salada.
- Grupo 4: Peces inoculados con **A.s.s** y mantenidos en agua dulce.
- Grupo 5: Acuario control agua salada.
- Grupo 5: Acuario control agua dulce.