

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

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL A TRAVÉS DE CUATRO VÍAS DE *Vibrio ordalii*
AISLADO EN CHILE EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).

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

MARÍA SOLEDAD PAREDES MICHEA

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. RICARDO ENRÍQUEZ.

PROFESOR COPATROCINANTE:

Dr. ENRIQUE PAREDES.

COLABORADOR:

Sra. MÓNICA MONRÁS.

PROFESORES CALIFICADORES:

Dr. ESTEBAN MOLINARI.

Dr. FERNANDO WITWER.

FECHA DE APROBACIÓN: 6 DE MAYO DE 2005.

A mis Papás

INDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	9
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	27
7. BIBLIOGRAFÍA	36
8. ANEXOS	41
9. AGRADECIMIENTOS	46

1. RESUMEN

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL A TRAVÉS DE CUATRO VÍAS DE *Vibrio ordalii* AISLADO EN CHILE EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).

Con el objetivo de reproducir experimentalmente la Vibriosis con un aislado chileno de *Vibrio ordalii* en salmón del atlántico (*Salmo salar*), se utilizaron 300 alevines de 15-20 g provenientes de una piscicultura sin antecedentes de Vibriosis. Durante la semana de aclimatación, fueron chequeados sanitariamente de acuerdo al protocolo de la Organización Internacional de Epizootias (OIE 2003). La cepa de *V. ordalii* (R157) se obtuvo del cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

Se utilizaron cuatro esquemas de inoculación: intraperitoneal ($5,7 \times 10^6$ ufc/pez), intramuscular ($5,7 \times 10^6$ ufc/pez), oral ($1,14 \times 10^7$ ufc/pez) y baño (8×10^6 ufc/ml) en grupos de 30 peces por cada vía en duplicado. Los peces controles fueron inoculados por las vías intraperitoneal e intramuscular con una solución salina estéril a una concentración de 1,5 %, en grupos de 30 peces por cada vía. Después de la inoculación, los peces permanecieron en acuarios con 80 l de agua a una salinidad de 10 ‰. Los acuarios fueron revisados diariamente y los peces muertos o moribundos fueron removidos y posteriormente chequeados sanitariamente durante los 30 días que duró el experimento.

Se logró reproducir la Vibriosis a través de la inoculación vía intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño. Para la vía IP, la mortalidad específica comenzó el día 6 post inoculación, alcanzando un 65 % de mortalidad acumulada. Para la vía IM, la mortalidad específica se observó a partir del día 5 post inoculación, alcanzando un 100 % de mortalidad acumulada. Por otra parte, a través de la vía baño la mortalidad específica comenzó el día 10 post inoculación, alcanzando un 18,3 % de mortalidad acumulada. En cuanto a la signología clínica, las tres lesiones más frecuentes para las tres vías fueron, exoftalmia uni/bilateral, bazo friable con esplenomegalia e hígado pálido y friable. La bacteria inoculada (*V. ordalii*) fue reaislada a partir del riñón de peces moribundos, utilizando TSA con 1% de NaCl. La vía oral no produjo mortalidad y no fue posible reaislar la bacteria a partir de ninguno de los peces sobrevivientes.

Se concluye que la Vibriosis puede ser reproducida en las condiciones en que se realizó este experimento, a través de la inoculación de un aislado nacional de *V. ordalii* a través de las vías: intraperitoneal, intramuscular y baño.

Palabras clave: inoculación experimental, *Vibrio ordalii*, salmón del atlántico, Vibriosis.

2. SUMMARY

EXPERIMENTAL INOCULATION OF ATLANTIC SALMON (*Salmo salar*) WITH A CHILEAN ISOLATE OF *Vibrio ordalii* BY INTRAPERITONEAL, INTRAMUSCULAR, ORAL AND BATH ROUTES.

In order to reproduce experimentally Vibriosis with a Chilean isolate of *V. ordalii* in Atlantic salmon (*S. salar*), 300 fish between 15 and 20 g body weight were used, proceeding from a fish farm free of Vibriosis. During the week for acclimation, a sanitary control of the fish was carried out according to the protocol of the World Organization for Animal Health (O.I.E 2003). The *V. ordalii* strain was obtained from the Universidad Austral de Chile.

Four inoculation schemes were used: intraperitoneal ($5,7 \times 10^6$ cfu/fish), intramuscular ($5,7 \times 10^6$ cfu/fish), oral ($1,14 \times 10^7$ cfu/fish), and bath (8×10^6 cfu/fish), in groups of 30 fish on each way on duplicated. The control fish were inoculated in intraperitoneal and intramuscular ways with a sterile saline solution (1,5 % NaCl), in groups of 30 smolts on each way. After the inoculation, fish were kept in 80 l water tanks at a 10 % salinity. Tanks were checked every day. The dead or dying fish were removed and subsequently submitted to sanitary controls during the 30 days of the experiment.

Inoculation program succeeded in intraperitoneal route (IP), intramuscularly (IM) and bath. On the IP route, mortality started on the 6th day after inoculation, reaching a 65% of accumulated mortality. On the IM route, mortality started on the 5th day after inoculation, and reached a 100% of accumulated mortality. On the other hand, in the bath route, mortality started on the 10th after inoculation, and the percentage of mortality reached was 18,3%. About clinic signs, the three most frequent injuries on the mentioned ways were exophthalmia uni/bilateral, congestive spleen and liver. The inoculated bacteria (*V. ordalii*) was isolated again from the kidney of a dying fish, using TSA with 1% NaCl. The oral way did not cause death and it was not possible to re isolate the bacteria from any other of the surviving fish.

The results show that Vibriosis can be reproduced on the conditions of this experiment, using a Chilean isolate of *V. ordalii* inoculated by intraperitoneal, intramuscular and bath routes.

Key words : experimental inoculation, *Vibrio ordalii*, Atlantic salmon, Vibriosis .

3. INTRODUCCIÓN

La salmonicultura ha llegado a ocupar un papel preponderante en la economía nacional. Su impacto ha sido positivo no sólo en términos de empleo y retornos por exportaciones, sino además como motor de desarrollo interno, especialmente en zonas aisladas del sur del país (Norambuena 2004). Este sector representa actualmente más del 51 % de las exportaciones pesqueras chilenas y el 5,6 % de las nacionales (Infante 2004).

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

En el ámbito local se cultivan cuatro especies: salmón del atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), salmón rey (*Oncorhynchus tshawytscha*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Lozano 2000).

Con el aumento en la producción, los peces han debido ser criados en condiciones de alta densidad poblacional y manejo intensivo, debido a lo cual las enfermedades infectocontagiosas se han convertido en una amenaza constante para la piscicultura nacional (Schafer y col 1990).

Las enfermedades en los peces no se deben a una causa única, sino que son producto de una estrecha interacción entre el 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).

Las enfermedades bacterianas son responsables de altas mortalidades tanto en peces de estado libre como en cautiverio. Investigaciones han permitido reconocer que las enfermedades en peces son causadas principalmente por microorganismos Gram negativos. Bacterias del género *Vibrio* producen en peces la enfermedad llamada “Vibriosis”, la cual ocasiona grandes epizootias con altas mortalidades en salmones cultivados en el Hemisferio Norte (Roberts 1989).

La familia *Vibrionaceae* está formada por 5 Géneros: *Aeromonas*, *Enhydrobacter*, *Photobacterium*, *Plesiomonas* y *Vibrio* (Baumann y col 1984, Holt y col 2000).

El género *Vibrio* está compuesto por bacilos Gram negativos. Son sensibles al vibriostático 2.4- diamino- 6.7- diisopropyl pteruidinephosphate (O/129). No son formadores de esporas. Fermentan carbohidratos, con la producción de ácido pero no de gas. Son ubicuarios y su hábitat natural son los ecosistemas marinos, estuarios y algunas especies pueden ser encontradas en agua dulce. Crecen a temperaturas entre 20-30 °C y muchas especies son patógenas para el hombre y para vertebrados e invertebrados marinos (Baumann y col 1984, Inglis y col 1993).

El género *Vibrio* contiene más de 34 especies, de las cuales 7 se asocian a enfermedades de peces, como patógenos primarios o invasores secundarios. Estas especies son: *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. damsela*, *V. carchariae*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. salmonicida* (Inglis y col 1993).

V. anguillarum, fue el primer vibrio aislado de peces en el Mediterráneo por Canestrini en 1893, en ese momento se le llamó *Bacterium anguillarum*. A pesar de que la enfermedad ya había sido descrita en 1718 por Bonaveri. La descripción y designación de *V. anguillarum* fue realizada por Bergman en 1909 (Roberts 2001).

El *Vibrio ordalii* fue considerado en un principio como *V. anguillarum* biotipo II, pero Schiewe y col (1981) determinaron que era fenotípicamente y genéticamente distinto de *V. anguillarum* y por ende que se trataba de una especie distinta (Egidius 1987, Actis y col 1999, Austin y Austin 1999).

V. anguillarum y *V. ordalii* son bacilos curvados y anaerobios facultativos. *V. anguillarum* mide 0.5 x 1.0 a 2.0. μ y *V. ordalii* 2.5-3.0 x 1.0 μ . Ambos son móviles gracias a que poseen un flagelo polar (Post 1983, Austin y Austin 1999, Actis y col 1999, Plumb 1999).

El contenido de G-C en el DNA de *V. anguillarum* es 43-46 moles % y de *V. ordalii* 43-44 % moles. Se ha demostrado mediante estudios de hibridación de DNA: DNA, que existe aproximadamente un 80 % de homología intraespecífica para *V. ordalii* y sólo un 58-69 % de homología con *V. anguillarum* (Austin y Austin 1999, Actis y col 1999).

V. ordalii puede ser cultivado a 30 °C en medio común semejante al TSA con la adición de 1% de NaCl. Genera colonias circulares, convexas, de un diámetro de 1-2 mm. Este

bacilo depende en gran medida del huésped para sobrevivir y por ende sólo puede ser aislado a partir de peces moribundos (Actis y col 1999).

La epizootiología de *V. ordalii* es semejante a la de *V. anguillarum* (Roberts 2001). Esencialmente la enfermedad se caracteriza por ser una septicemia hemorrágica. Durante la progresión de la infección, existe una correlación entre la presencia del vibrio en la sangre del hospedador y la disminución del número de las células blancas de la sangre. Esto sugiere la producción de un factor leucolítico por parte del bacilo, lo cual cumple un rol muy importante en la patogénesis de la enfermedad. La habilidad de aglutinar diferentes tipos de células eucarióticas, sugiere que *V. ordalii* puede atacar e interactuar con las células del hospedador (Actis y col 1999).

La enfermedad causada por ambas bacterias, es más prevalente en verano, cuando la temperatura del agua es mayor y el oxígeno disuelto es menor. A su vez, a mayor temperatura del agua, el porcentaje de mortalidad de los peces infectados es mayor (Plumb 1999).

La vía de infección de estos microorganismos no está clara, pero se sospecha de la transmisión vía oral. Como *Vibrio spp.* es habitante normal del tracto intestinal de peces sanos tanto en libertad como en cautiverio, bajo ciertas condiciones atraviesa el epitelio intestinal, colonizando hígado, bazo, músculo y branquias, causando así la enfermedad sistémica.*

El período de incubación está relacionado directamente con la temperatura del agua, calidad del agua, virulencia de la cepa y el grado de estrés al que se encuentre sometido el pez. Cuando se presenta un brote en un centro de cultivo, la mortalidad puede llegar hasta 50 %, especialmente en peces jóvenes (Roberts 2001).

Cuando el curso de la enfermedad es peragudo, se describe severa miocardiopatía, necrosis renal y esplénica y edema abdominal (Actis y col, 1999). Los primeros signos de la enfermedad son anorexia, oscurecimiento de la piel y muerte súbita. En los salmónidos, estos signos pueden ser los únicos en presentarse, a los que a veces se suma una hidropesía periorbital y / o abdominal (Roberts 1981).

Si el curso es agudo, aparecen en la piel protuberancias de color oscuro, que se ulceran liberando un exudado sanguinolento, causando de esta forma lesiones necróticas rojas en la musculatura. El tejido necrótico contiene un alto número de bacterias. Además puede presentarse eritema en la base de las aletas, alrededor de la boca y distensión intestinal con un claro fluido viscoso (Austin y Austin 1999, Roberts 2001). La principal característica de las

* Comunicación personal de P.A Reed y R. Francis, 1996. Disponible en http://deis.ifas.uflu/BODY_FA036.

lesiones internas cuando el curso es agudo, son la dilatación y licuefacción del bazo y riñón, petequias en peritoneo parietal y visceral. También se observan hemorragias focales en la superficie del corazón (Inglis y col 1993).

Cuando el curso es crónico, las lesiones de la piel pueden evolucionar hacia una granulomatosis, las branquias permanecen pálidas, reflejando una severa anemia. Las sucesivas hemorragias en la cavidad abdominal se convierten en adherencias fibrinosas entre las vísceras (Roberts 2001). En el ojo, se puede observar como primer síntoma, opacidad corneal, pudiendo llegar a la ulceración y pérdida del contenido de la cavidad orbitaria (Inglis y col 1993).

El diagnóstico de Vibriosis se realiza mediante la observación de los signos clínicos, aislamiento e identificación de la bacteria, a partir de hígado y riñón o de las lesiones, sobre Agar Soya Tripticasa (TSA), conteniendo 1-1.5 % de NaCl incubado a 20-25 °C durante 24-48 h. Es sensible al agente vibriostático O/129 y sus principales características bioquímicas son: Oxidasa positivos, Gelatinasa positivos, Reducción de Nitratos, Requerimiento de Na^{+2} para su crecimiento, etc. También se realizan pruebas serológicas utilizando un antisuero (American Fisheries Society 1992).

El examen histopatológico de los casos peragudos, revela la presencia de una importante miocardiopatía, necrosis renal y esplénica, y edema periorbital. En los casos agudos las lesiones cardiacas son menos graves, en estos casos se presentan lesiones en la piel que comprenden focos agudos de inflamación de la hipodermis que se extienden en profundidad dentro del músculo, estas lesiones a veces terminan por ulcerarse. Se observa una grave necrosis miofibrilar en el centro de las lesiones cutáneas que contiene un aglomerado de desechos de sarcoplasma, macrófagos, restos nucleares de basófilos y fibrina, y una diseminación de bacterias. En el hígado se desarrolla una necrosis focal y en riñón y bazo, una degeneración masiva junto a una necrosis de los elementos hematopoyéticos. En el riñón, la necrosis se extiende a los glomérulos renales, túbulos y con frecuencia a las células endocrinas del tejido interrenal. En los casos crónicos hay una severa anemia hemolítica producida por las toxinas lítica del vibrio, que terminan por convertirse en un gran depósito de hemosiderina en los centros de melanomacrófagos del tejido hematopoyético esplénico y renal (Roberts 1981, Inglis y col 1993, Roberts 2001).

El tratamiento y control, incluye el uso de antibióticos, vacunación y cultivo de otras bacterias que inhiben el crecimiento de ambos Vibrios. La selección del antibiótico a usar debe basarse en los resultados de un antibiograma (Reed y Francis 1996, Actis y col 1999). La terapia con antibióticos es el método más usado para el control de brotes clínicos de la enfermedad. Los medicamentos más utilizados son la oxitetraciclina, sulfonamidas potenciadas y los nitrofuranos, pero debido a que generalmente se administran por vía oral con

los alimentos, aquellos peces anoréxicos no reciben el tratamiento necesario (Roberts 1981, Inglis y col 1993).

Se ha comprobado que la inmunización y la selección genética, aumentan la resistencia de los salmónidos frente a las Vibriosis y disminuye considerablemente las muertes en comparación a aquellos peces que viven libres en la naturaleza (Roberts 1981).

Las vacunas tradicionales consisten en bacterias muertas en formalina y/o de componentes de su membrana. Éstas proporcionan una mejor protección cuando son aplicadas vía intraperitoneal que por vía oral o por inmersión. Sin embargo la vía intraperitoneal tiene algunas limitaciones: mayor costo, más difícil de aplicar y genera mayor estrés en los peces. Actualmente existen vacunas bivalentes que otorgan protección contra *V. anguillarum* y *V. ordalii* por 1.5 a 2 años después de la vacunación (Inglis y col 1993, Actis y col 1999).

Los primeros hallazgos de *Vibrio anguillarum* en Chile fueron entre 1988 y 1989. En dicha ocasión, se aislaron dos cepas de *V. anguillarum*, una de ellas fue del tracto digestivo de chorito (*Mytilus chilensis*) y la otra de lesiones externas de salmón coho (*O. kisutch*). Además, también se logró aislar *V. anguillarum* desde muestras de aguas marinas del sur de Chile (Carvajal y col 1989, Teuber y col 1989).

Durante 1990 se realizó un estudio en tres especies de salmonídeos en cultivo, provenientes de la X Región, para determinar la presencia o ausencia de *Vibrio spp* en dichos ejemplares. Este estudio concluyó que la totalidad de los peces examinados no presentaban signología clínica de Vibriosis, como tampoco se aisló *Vibrio spp*, *V. anguillarum* ni *V. ordalii* desde la sangre de estos peces (Muñoz 1990).

A partir del año 2003, se presentan en Chile brotes de Vibriosis producidos por *V. ordalii*, que afectaron inicialmente a salmón del atlántico (*S. salar*) y posteriormente a trucha arcoiris (*O. mykiss*) y a salmón coho (*O. kisutch*) cultivados en centros de mar y zonas estuarinas de las regiones X, XI y XII. Provocando mortalidades acumuladas promedio entre 5 y 22 % (Colquhoum y col 2004, Godoy 2004).

Es importante investigar acerca de esta enfermedad, buscando para ello modelos de desafíos eficientes que permitan su reproducción en especies susceptibles en forma exitosa. De esta forma, se podrán obtener nuevos antecedentes sobre las vías de ingreso del agente y de la patogenia de la enfermedad. El hecho de que permanezcan inciertos muchos aspectos sobre la Vibriosis, dificulta la aplicación de las medidas necesarias para lograr controlar de forma eficiente esta enfermedad. De esta forma se podrá prevenir no sólo importantes pérdidas

económicas, sino también limitar el riesgo permanente para la ictiofauna que comparte el mismo ecosistema con los peces de cultivo.

La hipótesis de este estudio es: La Vibriosis puede ser inducida experimentalmente con un aislado nacional de *V. ordalii* a través de cuatro vías de inoculación en salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g.

De lo anterior los objetivos del estudio son:

- Reproducir la enfermedad llamada Vibriosis, en salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g, mediante la inoculación experimental de una cepa de *V. ordalii* aislada en Chile por las vías intraperitoneal, intramuscular, oral y baño.
- Reaislar la bacteria inoculada (*V. ordalii*) a partir de los peces inoculados moribundos de Vibriosis.
- Comparar los porcentajes de mortalidad de los ejemplares inoculados por cuatro vías: intraperitoneal, intramuscular, oral y baño.
- Describir la signología clínica y hallazgos histopatológicos de Vibriosis.

4. MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

4.1. MATERIAL

Para el desarrollo de este desafío se utilizaron 300 salmones del atlántico (*S. salar*) de 15-20 g, pertenecientes a una piscicultura sin antecedentes de Vibriosis, ubicada en la X^a Región de los Lagos. En el desafío experimental se utilizó una cepa de *V. ordalii* proveniente del cepario (R 157) del Laboratorio de Ictiopatología, la cual fue aislada durante un brote ocurrido a fines del mes de Octubre del año 2003 en el sur de Chile, en salmón del atlántico (*S. salar*) de 100-160 g. Para la mantención de los peces se utilizó una mezcla de agua salada proveniente del sector de Calfuco, provincia de Valdivia y agua potable de clorada y pasada por filtros, logrando una salinidad final de 10 ‰.

Los materiales empleados de la Sala de Acuarios y de Laboratorio se detallan en el Anexo 1.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtención y mantención de los peces

Debido a las condiciones de transporte desde la piscicultura hasta el Laboratorio de Ictiopatología, se seleccionó un número de peces mayor al requerido tomando en cuenta posibles mortalidades por estrés, lesiones por manipulación y permitir una selección minuciosa una vez que los peces estuvieran establecidos en la sala de acuarios. El número seleccionado fue 770 alevines, los que fueron transportados en tres bidones plásticos 500 lt, con agua de la piscicultura y aireación constante, mediante difusores conectados a un tanque de oxígeno hasta su llegada a Valdivia. Los peces fueron ubicados en la Sala de Estanques del Laboratorio de Ictiopatología, donde previamente se habían acondicionado dos estanques con agua dulce, sistema de filtros y aireación constante para asegurar una adecuada oxigenación a la llegada de los peces. En estos dos estanques permanecieron hasta el día del desafío experimental.

Durante la permanencia en la Sala de Estanques, una muestra de 15 peces tomada al azar fue sometida a un chequeo sanitario (OIE 2003) a fin de descartar la presencia de agentes infectocontagiosos que pudieran desvirtuar los resultados obtenidos en el estudio. La alimentación de los peces consistió en una dieta seca comercial, en una cantidad equivalente al 2% de su peso corporal por día, administrada dos veces al día (AM y PM), utilizándose un fotoperíodo de 24 h luz.

4.2.2 Mantención de los peces y acuarios post-inoculación

Después de la inoculación, los peces permanecieron en acuarios con 80 lt de agua en recirculación constante con una salinidad aproximada de 10 ‰, medida mediante un densímetro. Además la Sala de Acuarios fue mantenida con un fotoperíodo de 24 h luz y se registró la temperatura del agua dos veces por día. Los acuarios fueron revisados diariamente y los peces muertos o moribundos fueron removidos, posteriormente chequeados sanitariamente durante los 30 días de duración del experimento.

Los cambios de agua se efectuaron una vez por semana. El agua utilizada fue evacuada desde los acuarios utilizando una manguera conectada a tambores de plástico, donde posteriormente era mezclada con cloro (6 g/lt) durante 2 a 3 horas, a fin de evitar la diseminación del agente. Junto con los cambios de agua también se realizó la mantención y limpieza de los filtros, efectuando la misma operación mencionada anteriormente con el agua contaminada resultante de esta operación. Los peces después de la necropsia fueron sometidos a un proceso de esterilización en el autoclave.

Como medida preventiva se utilizó cloro a una concentración de 6g/l para la desinfección periódica de la Sala de Acuarios, de materiales y en el pediluvio. En el caso de la desinfección de las manos se utilizó una solución de alcohol yodado.

4.2.3 Obtención de la cepa bacteriana.

La cepa de *Vibrio ordalii* (R157) se obtuvo del cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile. La dosis de bacteria a utilizar fue la Dosis Letal 50 (LD₅₀), equivalente a $2 \times 10^{7.54}$ ufc/ml.*

4.2.4 Preparación de la suspensión bacteriana de desafío

Para el desafío a través de las vías: oral, intraperitoneal e intramuscular se preparó una suspensión bacteriana en caldo TSA 1‰ NaCl, a una concentración determinada a través de

* Comunicación personal Carolina Treuquemil, estudiante de Medicina Veterinaria U.A.CH. (2004).

un espectrofotómetro¹ a una $DO_{600\text{ nm}} = 0,538$. La concentración bacteriana fue confirmada posteriormente a través de recuento en placa y el resultado fue de $5,7 \times 10^7$ ufc/ml. En el caso de la suspensión para la vía baño, fue necesario preparar una suspensión más concentrada preparándose 50 ml de suspensión bacteriana con una $DO_{600\text{ nm}} = 0,624$. La concentración bacteriana fue confirmada posteriormente a través de recuento en placa y el resultado fue de 8×10^8 ufc/ml, los cuales se diluyeron en 4,950 lt de agua (con una salinidad de 10 ‰), siendo la concentración final de la bacteria 8×10^6 ufc/ml.

4.3 INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS PECES

La totalidad de los peces se desafiaron simultáneamente el día 15 de Septiembre del 2004. Los peces fueron distribuidos en 10 acuarios con 30 peces cada uno, de los cuales 8 fueron grupos experimentales y los otros 2 correspondieron a los grupos controles. Como medida de manejo antes de inocular los peces, se anestesiaron vía baño con BZ -20^{®2} (Etil p aminobenzoato) a una dilución de 40 mg/lt por 2 a 4 min y con aireación constante para facilitar el efecto del anestésico.

En primer lugar se inocularon los dos grupos controles con una solución salina estéril al 1,5 % de NaCl, utilizando las vías intramuscular e intraperitoneal. Posterior a esto, los ocho grupos experimentales (Ver tabla 1) se desafiaron en duplicado a través de cuatro vías: baño, intraperitoneal, intramuscular y oral, en este mismo orden. Una vez inoculados los peces, se ubicaron en sus respectivos acuarios, los cuales estaban previamente rotulados y acondicionados con un sistema de filtros de carbón activado y perlón, además de aireación constante, termómetros y calefactores. Los acuarios de los grupos controles fueron ubicados frente a los acuarios de los peces desafiados.

¹ Spectronic tipo Génesis 8.

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

Tabla 1: Vías de inoculación de *V. ordalii* y concentración bacteriana inoculada en salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g a una salinidad de 10 ‰.

Grupo	Vía de inoculación	Número de peces inoculados	Volumen inoculado (ml)	Concentración bacteriana inoculada
1	Intraperitoneal	30	0,1	$5,7 \times 10^6$ ufc/pez.
2	Intraperitoneal	30	0,1	$5,7 \times 10^6$ ufc/pez.
3	Intramuscular	30	0,1	$5,7 \times 10^6$ ufc/pez.
4	Intramuscular	30	0,1	$5,7 \times 10^6$ ufc/pez.
5	Oral	30	0,2	$1,14 \times 10^7$ ufc/pez.
6	Oral	30	0,2	$1,14 \times 10^7$ ufc/pez.
7	Baño	30	50	8×10^6 ufc/ml.
8	Baño	30	50	8×10^6 ufc/ml.
Control (IM)	Intraperitoneal	30	0,1	-
Control (IP)	Intramuscular	30	0,1	-

-: Ausencia en el inóculo de bacterias.

4.3.1 Desafío intraperitoneal

Se inoculó en la línea media ventral en un área entre el largo de las aletas pectorales y a una distancia equivalente al largo de las aletas pélvicas. Se administró por esta vía mediante una jeringa de tuberculina 0,1 ml de la suspensión bacteriana a una concentración de $5,7 \times 10^7$ ufc/ml, lo que correspondió a una concentración de $5,7 \times 10^6$ ufc/pez.

4.3.2 Desafío intramuscular

Se inoculó anterior y levemente lateral a la aleta dorsal en sentido oblicuo dorso-ventral caudo-craneal 0,1 ml de la suspensión bacteriana a una concentración de $5,7 \times 10^7$ ufc/ml, lo que correspondió a una concentración de $5,7 \times 10^6$ ufc/pez.

4.3.3 Desafío oral

A través de intubación bucoesofágica con una sonda de 1 mm de diámetro y 5 cm de largo, adherida a una jeringa de tuberculina, se administró 0,2 ml/pez de una suspensión

bacteriana a una concentración de $1,14 \times 10^8$ ufc/ml, lo que correspondió a una concentración de $1,14 \times 10^7$ ufc/pez.

4.3.4 Desafío por baño

Los peces fueron introducidos en un balde con 4,950 lt de agua con una salinidad de 10 ‰ a una temperatura promedio de los dos baldes de 13,7 °C más 50 ml de suspensión bacteriana a una concentración de 8×10^8 ufc/ml, lo que correspondió a una concentración final de 8×10^6 ufc/ml, donde permanecieron durante una hora, con aireación constante. Posteriormente fueron trasladados a los acuarios correspondientes.

4.3.5 Grupos controles

Los peces fueron inoculados a través de las vías intramuscular e intraperitoneal, pero el inóculo consistió en 0,1 ml de una solución salina estéril a una concentración de 1,5 %.

4.4 CONFIRMACIÓN DE LA MORTALIDAD POR *V. ordalii*

4.4.1 Estudio clínico y anatomopatológico

Cada pez muestreado (muerto o moribundo) fue examinado mediante inspección directa, describiendo macroscópicamente las alteraciones externas de la piel, aletas, ojos, branquias y cavidad bucal. Finalizado el examen externo de los peces, se procedió a realizar la necropsia de acuerdo al American Fisheries Society (1992) y mediante una acuciosa observación de cada órgano de la cavidad abdominal, se describieron las alteraciones internas macroscópicas, para luego ser registradas individualmente.

4.4.2 Siembra y cultivo bacteriano

Se tomaron muestras de riñón de cada pez examinado, las que fueron sembradas mediante estrás con un asa estéril en placas con Agar Soya Tripticasa (TSA) 1 % NaCl, para luego ser incubadas en una estufa a 22-23 °C por siete días, para observar el desarrollo de colonias bacterianas con morfología similar a *V. ordalii*.

A partir de colonias aisladas, se realizó un repicaje por cada vía, en Agar TSA 1% NaCl, con el fin de obtener un cultivo puro y a partir de éste realizar test de aglutinación rápida en placa (Mono-Va^{®3}), sensibilidad al vibriostático O/129 (Oxoid^{®4}) y pruebas bioquímicas.

³ Bionor Skien- Norway.

4.4.3 Tinción de Gram

De cada ejemplar muestreado, se realizaron improntas de hígado, bazo y riñón, los cuales se fijaron con calor, para ser teñidos posteriormente con Tinción de Gram. Luego fueron observados con microscopio óptico con lente objetivo 100 x, para determinar en forma rápida la presencia de bacilos Gram negativos en dichos tejidos.

4.4.4 Estudio Histopatológico

Se tomaron muestras de hígado, riñón, bazo, corazón y tercio posterior de intestino a partir de peces moribundos. En el caso de los peces inoculados Vía Intramuscular, se tomaron también muestras de piel con músculo de la zona de inoculación. Las muestras (fijadas previamente en formalina tamponada al 10 %) fueron laminadas y procesadas en autotécnico a fin de ser deshidratadas e impregnadas en parafina. Finalmente fueron incluidas en parafina sólida, cortadas mediante micrótopo a 5-6 μm de grosor y teñidas con hematoxilina –eosina (Luna 1968), con el propósito de analizar mediante observación microscópica las alteraciones encontradas. Todo el procesamiento y observación de las muestras fue realizado en el Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile.

4.4.5 Análisis de los Resultados

Los resultados se presentan en tablas descriptivas con el número de casos y porcentajes. Además, se presentan figuras con imágenes de las lesiones observadas, gráficos de mortalidad acumulada y de temperatura de los acuarios.

⁴ P.V. Equip Ltda. Los Capitanes 1388 Providencia, Santiago- Chile.

5. RESULTADOS

5.1 MORTALIDADES

5.1.1 Mortalidad grupo Vía Intraperitoneal

La mortalidad específica para los grupos, 1 y 2, producto del desafío con *V. ordalii* se observó a partir del 6° día post inoculación (p.i) alcanzando el mayor porcentaje de mortalidad diaria el 7° día p.i para el grupo 1 con un 36,6% y para el grupo 2 entre los días 8° y 11° p.i con un 13,3 % (Ver Gráfico 1). La mortalidad acumulada específica para el grupo 1 alcanzó a 19 peces (63,3 %) y 20 peces (66,6%) para el grupo 2. La mortalidad acumulada específica de la vía intraperitoneal (grupos 1 y 2) fue de 39 peces (65 %).

En el grupo 1 se registró una mortalidad inespecífica de 3 peces, en los cuales no fue posible reaislar *V. ordalii*. Esta mortalidad no fue incluida para los cálculos de mortalidad acumulada específica, pero sí en los registros de mortalidad diaria total (Ver Anexo 2).

No se registraron mortalidades a partir del 13° día p.i para el grupo 1 y a partir del 17° para el grupo 2 (Ver tabla 2). Sobrevivieron a la inoculación intraperitoneal 8 peces en el grupo 1 y 10 en el grupo 2. Esto indica que en esta vía (grupos 1 y 2) sobrevivió el 30% del total de los peces inoculados intraperitonealmente.

5.1.2 Mortalidad grupo Vía Intramuscular

La mortalidad específica para los grupos 3 y 4, se observó a partir del 5° día p.i, alcanzando el mayor porcentaje de mortalidad diaria específica el 6° día p.i para ambos grupos, con un 53,3 % para el grupo 3 y 63,3 % para el grupo 4 (Gráfico 1). La mortalidad acumulada específica para ambos grupos 3 y 4 alcanzó a 30 peces (100 %). La mortalidad específica acumulada de la vía intramuscular (grupos 3 y 4) fue de 60 peces (100 %).

No se registraron mortalidades a partir del 8° día p.i para el grupo 3 y a partir del 10° para el grupo 4 (Ver tabla 2). No hubo peces sobrevivientes inoculados por esta vía.

5.1.3 Mortalidad grupo Vía Baño

La mortalidad específica producto del desafío con *V. ordalii* se observó a partir del 10° día p.i para el grupo 7 y del 15° día p.i para el grupo 8. Alcanzando el mayor porcentaje de mortalidad diaria específica el 10° día p.i para el grupo 7 con un 16,6 %. En el caso del grupo

8, el mayor porcentaje de mortalidad diaria específica ocurrió el 15° y 16° día p.i, con un 3,3 % (Gráfico 1). La mortalidad acumulada específica para el grupo 7 fue 9 peces (30 %) y 2 peces (6,7 %) para el grupo 8. La mortalidad específica acumulada de la vía baño (grupos 7 y 8) fue de 11 peces (18,3 %).

En el grupo 7 se registró una mortalidad inespecífica de 1 pez y en el grupo 8 de 28 peces, en los cuales no fue posible reaislar *V. ordalii*. Esta mortalidad no fue incluida para los cálculos de mortalidad acumulada específica, pero si en los registros de mortalidad diaria total (Ver Anexo 2).

No se registraron mortalidades a partir del 24° día p.i para el grupo 7 y a partir del 21° día para el grupo 8 (Ver tabla 2). En el grupo 7 sobrevivieron 20 peces a la inoculación vía baño y en el grupo 8 no hubo peces sobrevivientes.

5.1.4 Mortalidad grupo Vía Oral

En los peces inoculados por esta vía no se observaron mortalidades durante los 30 días que duró el experimento. Estos peces no presentaron signología clínica de la enfermedad. El último día del experimento fueron sacrificados y de ninguno de ellos fue posible reaislar el agente a través del chequeo bacteriológico.

5.1.5 Mortalidad grupos Controles

No se produjeron mortalidades durante el período de ensayo. Tampoco se observaron cambios conductuales durante el periodo de estudio. Los peces fueron sacrificados al final del experimento y el chequeo bacteriológico efectuado a cada uno de ellos fue negativo.

Tabla 2: Mortalidad acumulada específica por Vibriosis en *S. salar* (15-20 g), inoculados vía intraperitoneal, intramuscular, oral y baño con *V. ordalii*; mantenidos por 30 días a una T° promedio de 14,3 °C y una salinidad de 10 ‰.

Días post inoculación	MORTALIDAD ACUMULADA ESPECIFICA							
	Vía Intraperitoneal		Vía Intramuscular		Vía Oral		Vía Baño	
	grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4	grupo 5	grupo 6	grupo 7	grupo 8
1 a 4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	6	1	-	-	-	-
6	4	1	22	20	-	-	-	-
7	15	4	30	26	-	-	-	-
8	15	8	30	29	-	-	-	-
9	16	9	30	30	-	-	-	-
10	16	12	30	30	-	-	5	-
11	17	16	30	30	-	-	5	-
12	19	18	30	30	-	-	6	-
13	19	18	30	30	-	-	6	-
14	19	19	30	30	-	-	6	-
15	19	19	30	30	-	-	7	1
16	19	20	30	30	-	-	8	2
17 a 30	19	20	30	30	-	-	8	2

- : Ausencia de muertes.

La temperatura promedio del agua de los acuarios durante los 30 días que duró el experimento, fue de 14,3 °C, con un rango de variación entre 12 y 17 °C (Ver Anexo 3 y Gráfico 1).

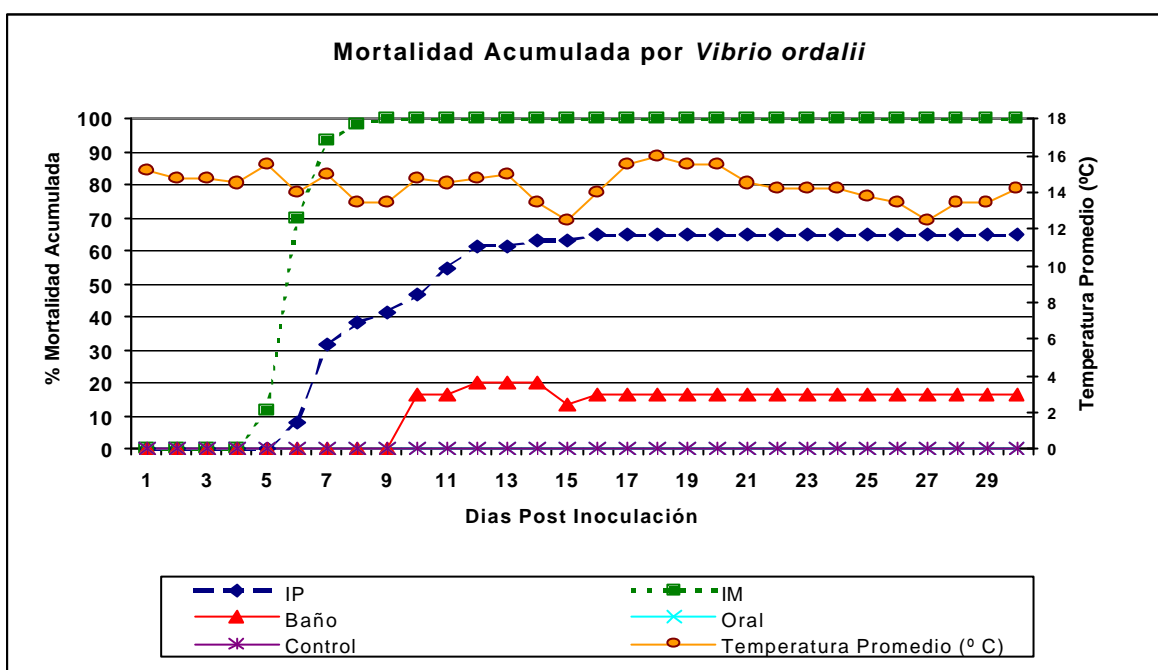


Gráfico 1 : Evolución de la mortalidad acumulada específica por Vibriosis en *S. salar* (15-20 g), inoculados a través de las vías intraperitoneal (IP), intramuscular (IM), baño y oral con *V. ordalii* y variación diaria de la temperatura del agua de los acuarios mantenidos por 30 días a una salinidad de 10 ‰.

5.2 CONFIRMACIÓN DE LA MORTALIDAD POR *Vibrio ordalii*

5.2.1 Signología clínica

Mediante el examen anatomopatológico realizado a los peces muertos y moribundos de Vibriosis, se pudo observar signos clínicos más comunes, las cuales se presentan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3: Signos clínicos presentes en *S. salar* (15-20 g) inoculados experimentalmente con *V. ordalii* a través de las vías intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño, mantenidos a una temperatura promedio de 14,3 °C y a una salinidad de 10 ‰.

Signos Clínicos	Vía de Inoculación					
	IP (n = 39)		IM (n = 60)		Baño (n = 11)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Edema zona inoculación	-	-	38	63,33	-	-
Hemorragia zona inoculación	-	-	11	18,33	-	-
Exoftalmia uni/bilateral	20	51,28	31	51,67	9	81,82
Hemorragia base aletas	22	56,41	9	15	1	9,09
Hemorragia intestino posterior	3	7,69	4	6,67	2	18,18
Hemorragia poro urogenital	13	33,33	26	43,33	-	-
Hemorragia cavidad bucal	4	10,26	4	6,67	1	9,09
Hemorragia lingual	12	30,77	20	33,33	2	18,18
Hemorragia ocular	21	53,85	12	20	6	54,55
Opacidad corneal	9	23,08	1	1,67	4	36,36
Hígado pálido y friable	28	71,79	36	60	5	45,45
Bazo friable y esplenomegalia	21	53,85	30	50	5	45,45

- : No presentaron dicha Signología.

La presente tabla indica que la lesión que se presentó con mayor frecuencia en los peces inoculados vía IP fue hígado pálido y friable (71,79 %), seguida por hemorragia en la base de las aletas (56,41 %). En los peces inoculados vía IM, la lesión más común fue el edema de la zona de inoculación (63,33 %), seguida por hígado pálido y friable (60 %). En el caso de la vía baño, la lesión más común entre los peces inoculados fue exoftalmia uni/bilateral (81,82 %), seguida por hemorragia ocular (54,55 %) (Ver Figuras 1 y 2).

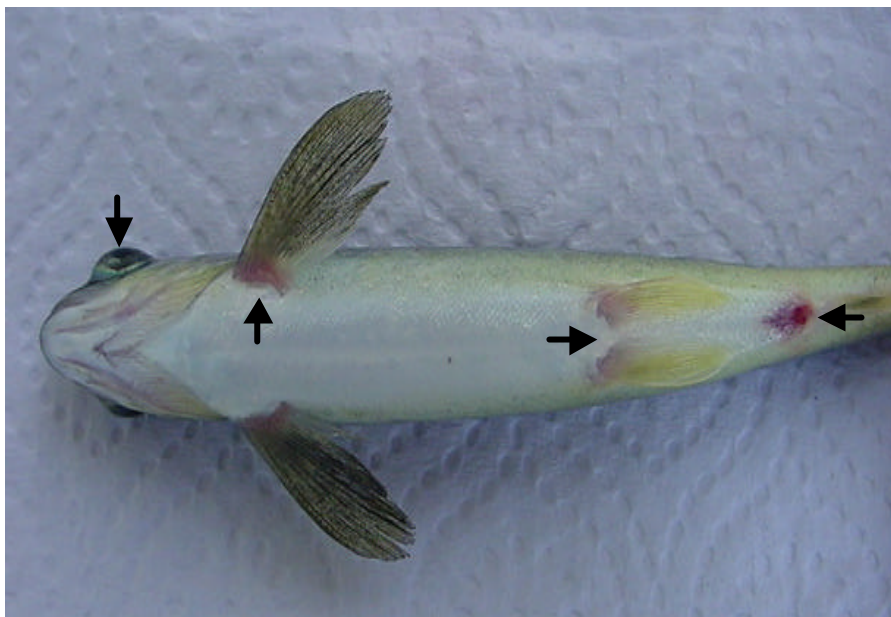


Figura 1: Salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g inoculado con *V. ordalii* con exoftalmia (↓), hemorragia en base de aletas pares (↑ y →) y poro urogenital (←).

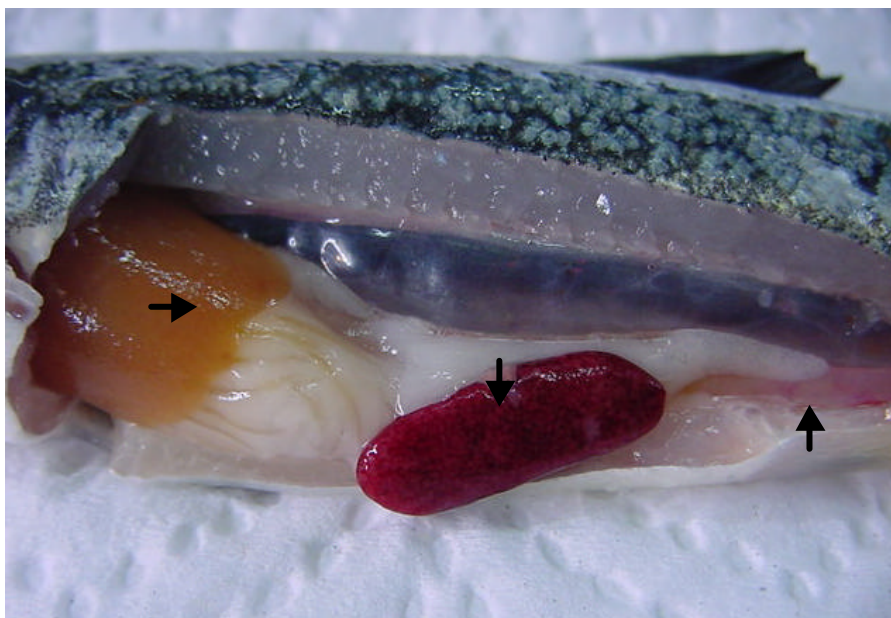


Figura 2: Salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g inoculado con *V. ordalii* con hígado pálido (→), esplenomegalia (↓) y hemorragia en intestino posterior (↑).

5.2.2 Tinción de Gram

Se realizó Tinción de Gram a frotis de hígado, bazo y riñón. El órgano en el cual se observó con mayor frecuencia bacilos Gram negativos en las tres vías de inoculación fue el bazo. En el caso de la vía IM, esta frecuencia alcanzó el 100%. A su vez, el órgano con menor frecuencia de observación de bacilos Gram negativos en las tres vías fue el hígado (Ver Tabla 4). También fue posible observar un aumento de la melanina en bazo y riñón.

Tabla 4: Observación de bacilos Gram negativos en improntas de hígado, bazo y riñón de *Salmo salar* (15-20 g), inoculados con *V. ordalii* por las vías intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño, mantenidos a una temperatura promedio de 14,3 °C y a una salinidad de 10 ‰.

Vía de Inoculación	Observación de bacilos Gram negativos					
	Hígado		Bazo		Riñón	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
IP (n =39)	27	69,23	36	92,31	34	87,18
IM (n =60)	49	81,67	60	100	60	100
Baño (n =9)	3	27,27	5	45,45	4	36,36

5.2.3 Cultivo bacteriológico

De la totalidad de los peces muestreados con Vibriosis, se aisló de riñón *V. ordalii* en Agar TSA 1% NaCl. Las placas fueron incubadas a 22-23 °C por siete días, presentando crecimiento bacteriano a las 48 h, observando colonias pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro circulares, solevantadas, blanquecinas y filantes.

A partir de una placa de cada vía de inoculación, se realizó un repicaje con el fin de obtener un cultivo puro. Luego a partir de éste, se realizó el Test de Aglutinación rápida (Mono-Va[®]), siendo positivo para las tres vías. También se realizó el Test de sensibilidad al vibriostático O/129, siendo positivo para las tres vías, con un halo de inhibición que varió de 3.7 a 4.4 cm de diámetro. Además se realizaron pruebas bioquímicas, cuyo resultado se detalla en el Anexo 5.

5.2.4 Histopatología

En la Tabla 5 se presentan los hallazgos histopatológicos observados en muestras de riñón de peces moribundos inoculados con *V. ordalii*.

Tabla 5: Hallazgos histopatológicos renales de *S. salar* de 15 a 20 g, inoculados vía intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño con *V. ordalii*; mantenidos a una temperatura promedio de 14,3 °C, a una salinidad de 10 ‰ y muestreados los días 6,7,10 y 15 días post inoculación (p.i).

Hallazgos histopatológicos	Vía de Inoculación					
	IM		IP		Baño	
	6 días p.i	7 días p.i	6 días p.i	7 días p.i	10 días p.i	15 días p.i
Edema intersticial	-	+	-	-	-	-
Necrosis intersticial	-	++	++	-	-	-
Bacterias en glomérulos	-	+	+	-	-	-
Proliferación de CMM	++	++	+	++	++	++
Glomerulonefritis	++	+	-	++	-	+++
Túbulonefrosis	++	-	-	-	-	-
Nefritis con infiltración perivascular	+++	+	+	+++	++	++

-: ausente

+: leve

++: moderada

+++ : severa

CMM: células melanomacrofágicas

p.i: post inoculación

En la presente tabla se indica que los hallazgos histopatológicos renales más frecuentes, fueron la proliferación leve a moderada de células melanomacrofágicas y la nefritis con infiltrado perivascular leve a severa. Además en dos de las seis muestras analizadas se observaron bacterias en glomérulos renales.

En la Tabla 6 se presentan los hallazgos histopatológicos observados en muestras de hígado de peces moribundos inoculados con *V. ordalii*. La muestra correspondiente al día 10 post inoculación de la vía baño, no se incluye en la tabla por extravío en el procesamiento.

Tabla 6: Hallazgos histopatológicos hepáticos de *S. salar* de 15 a 20 g, inoculados vía intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño con *V. ordalii*; mantenidos a una temperatura promedio de 14,3 °C, a una salinidad de 10 ‰ y muestreados los días 6,7 y 15 días post inoculación.

Alteraciones histopatológicas	Vía de Inoculación				
	IM		IP		Baño
	6 días p.i	7 días p.i	6 días p.i	7 días p.i	15 días p.i
Perivascularitis necrotizante con	+	+	++	++	+
Atrofia hepática	++	++	-	-	-
Tumefacción hepática	-	-	+	+	++

-: ausente

+: leve

++: moderada

+++ : severa

p.i: post inoculación

A través de la presente tabla, se desprende que el hallazgo que se presentó con mayor frecuencia entre las muestras hepáticas analizadas fue la perivascularitis necrotizante con edema, la cual varió de leve a moderada (Ver Figura 3).

En la Tabla 7 se presentan los hallazgos histopatológicos observados en muestras de bazo de peces moribundos inoculados con *V. ordalii*.

Tabla 7: Hallazgos histopatológicos esplénicos de *S. salar* de 15 a 20 g, inoculados vía intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño con *V. ordalii*, mantenidos a una temperatura promedio de 14,3 °C, a una salinidad de 10 ‰ y muestreados los días 6,7,10 y 15 días post inoculación.

Hallazgos histopatológicos	Vía de Inoculación					
	IM		IP		Baño	
	6 días p.i	7 días p.i	6 días p.i	7 días p.i	10 días p.i	15 días p.i
Proliferación Cél. Reticulares	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bacterias	++	+++	+	-	-	+++
Necrosis focales	-	-	-	+	-	+
Hemosiderosis	-	-	-	-	+	-

-: ausente

+: leve

++: moderada

+++ : severa

p.i: post inoculación

La presente tabla muestra que el hallazgo más frecuente entre las muestras de bazo analizadas, fue la proliferación de células reticulares, siendo severa en todas éstas. Además se observaron bacterias en cuatro de las seis muestras analizadas.

En la Tabla 8 se presentan los hallazgos histopatológicos observados en muestras de corazón de peces moribundos inoculados con *V. ordalii*.

Tabla 8: Hallazgos histopatológicos cardiacos de *S. salar* de 15 a 20 g, inoculados con vía intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño *V. ordalii*; mantenidos a una temperatura promedio de 14,3 °C, a una salinidad de 10 ‰ y muestreados los días 6,7,10 y 15 días post inoculación.

Hallazgos histopatológicos	Vía de Inoculación					
	IM		IP		Baño	
	6 días p.i	7 días p.i	6 días p.i	7 días p.i	10 días p.i	15 días p.i
Epicarditis Focal	++	+	-	+	+	+
Bacterias	+	+	++	-	-	-

-: ausente

+: leve

++: moderada

+++ : severa

p.i: post inoculación

La presente tabla indica que el hallazgo más frecuente entre las muestras de corazón fue la epicarditis focal leve. Además se observaron bacterias en tres de las seis muestras analizadas, las cuales pertenecían a las vías de inoculación IM e IP(Ver Figura 4).

En la tabla 9 se presentan los hallazgos histopatológicos observados en muestras de intestino posterior de peces moribundos inoculados con *V. ordalii*. La muestra correspondiente al día 7 post inoculación de la vía intramuscular, no se incluye en la tabla por extravío en el procesamiento

Tabla 9: Hallazgos histopatológicos de intestino posterior de *S. salar* de 15 a 20 g, inoculados con *V. ordalii* vía intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) y baño; mantenidos a una temperatura promedio de 14.3 °C, a una salinidad de 10 ‰ y muestreados los días 6,7,10 y 15 días post inoculación.

Alteraciones histopatológicas	Vía de Inoculación				
	IM	IP		Baño	
	6 días p.i	6 días p.i	7 días p.i	10 días p.i	15 días p.i
Enteritis con bacterias	-	+++/+	-	-	-
Células descamadas en lumen con bacterias	-	-	-	-	+++/+

-: ausente

+: leve

++: moderada

+++ : severa

p.i: post inoculación

En esta tabla se indica que dos de las cinco muestras analizadas presentaron hallazgos histopatológicos, una muestra corresponde a la vía IP y la otra a la vía baño.

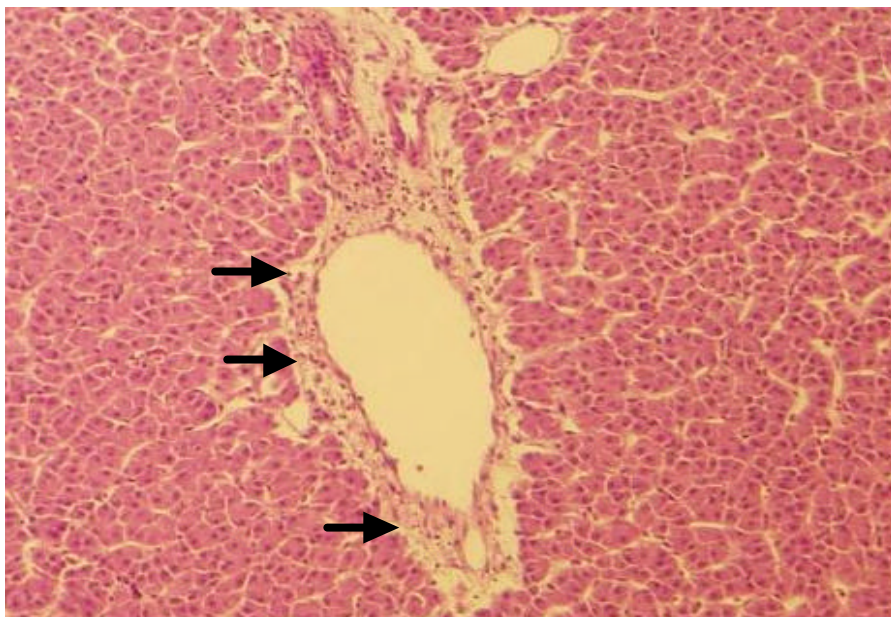


Figura 3: Hígado de salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g, inoculado con *V. ordalii* con edema e inflamación perivascular (→).

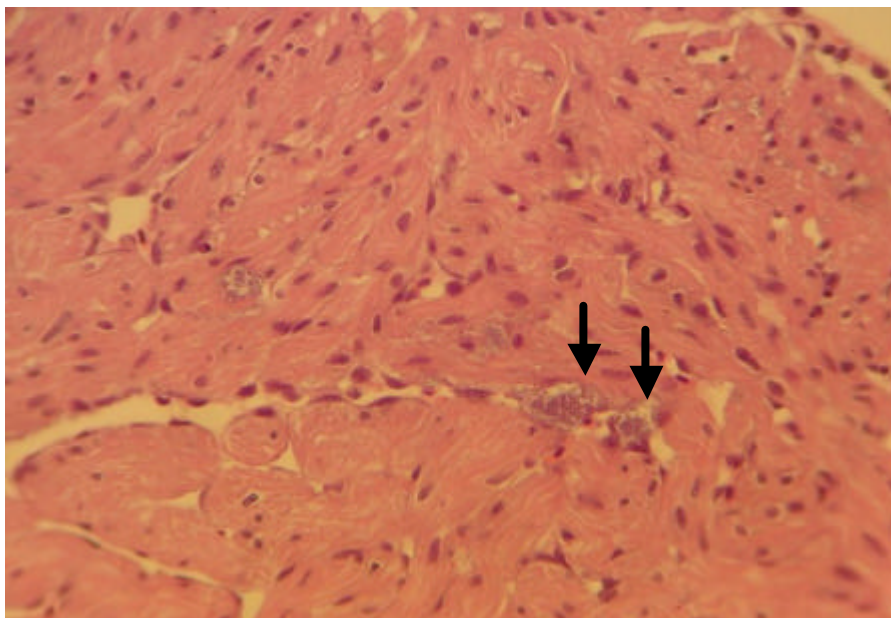


Figura 4: Corazón de salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g, inoculado con *V. ordalii* con presencia de bacterias (↓).

6. DISCUSIÓN

El mayor porcentaje de mortalidad entre las vías de inoculación, fue alcanzado por la vía intramuscular (IM) llegando al 100 % de mortalidad acumulada específica (mortalidad verificada por el reaislamiento de *V. ordalii*), la cual comenzó el día 5 post inoculación y cesó el día 9. Esto indica que el curso de la enfermedad fue agudo. Tanto el curso de la enfermedad como los porcentajes de mortalidad acumulada específica, fueron similares en los grupos 3 y 4 de salmón del atlántico (*S. salar*) inoculados por esta vía. El curso de la enfermedad se asemejó a lo obtenido en el desafío realizado por esta misma vía con *A. salmonicida* en *S. salar* de 15 a 20 g. En este desafío las mortalidades se produjeron entre los días 4 y 12 post inoculación (Quinteros 2004). Mientras que en el trabajo realizado a través de esta vía por Brossard (1999) con el agente U2 (RLO) también en *S. salar* de 15 a 20 g, las mortalidades se produjeron entre los días 18 y 48 post inoculación. La diferencia de los días en que ocurrió la mortalidad en el desafío realizado por Brossard (1999), se podría explicar por la dosis bacteriana inoculada por pez, ya que en este caso, la dosis fue $1,5 \times 10^4$ ufc/pez, mientras que en el desafío con *V. ordalii* fue $5,7 \times 10^6$ ufc/pez, lo que pudo ocasionar la mortalidad más aguda.

La alta mortalidad lograda por la vía IM se puede explicar porque al introducir la bacteria directamente a la zona muscular, se sobrepasan todas las barreras naturales de defensa del pez (Amend 1981). Además, *V. ordalii* posee un alto grado de tropismo por el tejido muscular y cutáneo (Godoy 2004). Esto se suma a uno de los factores más importantes de virulencia de la bacteria, su capacidad proteolítica, debido a que posee proteasas, que producen una severa mionecrosis y liquefacción focal, especialmente en la musculatura esquelética (Larsen y Møllergaard 1984, Inglis y col 1993, Spanggaard y col 2000). Esto se manifestó como uno de los signos que presentaron los peces inoculados por esta vía, ya que 38 de los peces muestreados (63,3 %), presentaron edema en la zona de inoculación y 11 (18,3 %) hemorragia en la misma zona. Esto concuerda con Actis y col (1999), que indicó que *V. anguillarum* puede causar necrosis y hemorragias en los tejidos infectados. A su vez, Bergljót y Slavko (2000) mencionan que la vía IM produce una lesión en la zona de inoculación debido a una mayor concentración de bacterias y al efecto toxigénico de los productos extracelulares de estas mismas.

La segunda vía de inoculación con mayor mortalidad acumulada por Vibriosis fue la vía intraperitoneal (IP), la cual alcanzó un 65 %. La mortalidad se inició el día 6 y cesó el día 16 post inoculación. Esto indica que el curso de la enfermedad fue agudo. Tanto el curso de la enfermedad y los porcentajes de mortalidad acumulada específica, fueron similares para los grupos 1 y 2 de salmón del atlántico (*S. salar*) inoculados por esta vía. En otro desafío realizado con *V. ordalii* por la vía IP en *S. salar* de 25 g, se logró un 100 % de mortalidad

acumulada entre los días 6 y 23 post inoculación. La dosis utilizada en este desafío, ni las condiciones en que éste se realizó fueron reveladas por el Laboratorio que lo patrocinó*. En otro desafío con otras especies de salmonídeos, se determinó que *O. keta* y *O. nerka* morían después de 48 h de haber sido inoculados vía IP con 0,1 ml que contenían 1×10^7 ufc de *V. anguillarum* (Austin y Austin 1999).

Mediante la vía IP, también se ha logrado reproducir otras enfermedades causadas por bacterias Gram negativas como U2 (Brossard 1999) y *A. salmonicida* (González 2002, Quinteros 2004) en salmón del atlántico (*S. salar*) de 15 a 20 g y *Piscirickettsia salmonis* (Pérez 1996, Pizarro 1998, Ojeda 2000) en trucha arcoiris de 10 a 15 g y en salmón coho (*O. kisutch*) de 10 g (Estay 2003). En estos desafíos, se lograron mortalidades acumuladas que van desde 47 hasta 100 %. El éxito de la vía IP para reproducir la Vibriosis, se puede atribuir a que esta vía permite el ingreso directo de *V. ordalii* a la cavidad peritoneal huésped, evitando de esta forma las barreras naturales de defensa del pez.

En cuanto al volumen del inóculo utilizado en las vías IM e IP(0,1 ml) éstos coinciden con los utilizados en un desafío con otra bacteria del Género *Vibrio* (Austin y Austin, 1999), con dos desafíos con *A. salmonicida* (González, 2002 y Quinteros, 2004) y con tres realizados con *P. salmonis* (Pizarro 1998, Ojeda 2000, Estay 2003).

La inyección de agentes no es un método natural de desafío, ya que muchos de los mecanismos normales de defensa son sobrepasados artificialmente. Además el uso de inyecciones como vía de inoculación para reproducir experimentalmente una enfermedad, tiene la dificultad que omite los mecanismos que utiliza el agente para la penetración al huésped. Es muy probable que dadas las condiciones del ambiente acuático, la capacidad de adhesión del agente puede ser crucial para lograr establecer un proceso infeccioso (Evelyn 1996).

Los esquemas de baño o inmersión son ampliamente utilizados como método de desafío o vía de inmunización en peces. Esta vía ha permitido la reproducción experimental de Furunculosis, Yersiniosis y Vibriosis. Porque aunque es artificial, es la que mejor simula la situación natural (Amend 1981). Ya que, los peces no se extraen del agua, por lo que se minimiza el estrés por manipulación y se expone la totalidad de la superficie corporal, incluyendo aberturas naturales, piel, branquias, ojos, mucosas y otros tejidos en forma simultánea a la bacteria (Pizarro 1998, Ojeda 2000). Sin embargo, dependiendo de la bacteria y la especie del pez, algunas de estas eventuales rutas son más eficientes para el ingreso de microorganismos que otras. Referente a las posibles puertas de entrada de *V. anguillarum* por medio de desafíos vía baño, se puede indicar que Robohm y Koch (1995), demostraron que en desafíos realizados por esta vía en goldfish (*Carassius auratus*), la ingestión es una de las

* Comunicación personal K. Gravningen y col, Laboratorio Alparma, 2004.

principales rutas de ingreso de antígenos, estimando que el volumen de ingestión sería aproximadamente 0,37 ml/h, valor superior al que ingresaría por otros tejidos. Esto concuerda con lo descrito por Nelson y col (1985), quienes luego de una breve exposición de los peces en una suspensión con esta bacteria, pudieron observarla inmediatamente después en el tracto gastrointestinal de los peces desafiados. Por otra parte, las branquias son una ruta de entrada muy importante para ciertos patógenos, debido a que reciben constantemente flujos de agua que pueden contener microorganismos. Para disminuir esto, están cubiertas por una capa de mucus, que minimiza el contacto de estos microorganismos con las laminillas branquiales. Además se sabe que su superficie está cubierta principalmente por un epitelio simple, por lo que teóricamente es más fácil de penetrar que la piel, que es histológicamente un obstáculo más grueso y compacto (Kanno y col 1989, Evelyn 1996).

En un desafío realizado en trucha arcoiris (*O. mykiss*) se sugirió que las branquias son el sitio de entrada para *V. anguillarum*. Sin embargo, otros estudios realizados indican que éstas no son un sitio de entrada importante, ya que en un estudio realizado en turbot (*Scophthalmus maximus*), luego de la inoculación directa de esta bacteria sobre las branquias, no fue posible reaislarla desde el bazo (Spanggaard y col 2000). En cambio, Kanno y col (1989) lograron un 3% de mortalidad en ayu (*Plecoglossus altivelis*) desafiados con *V. anguillarum* a través del contacto directo de la bacteria sobre las branquias del pez.

En relación a la piel, se debe señalar que es una excelente barrera para la penetración de los microorganismos, ya que la epidermis constituye una barrera física y química (Evelyn 1996). *V. anguillarum* tiene motilidad quimiotáctil hacia la piel y gracias a su flagelo polar es capaz de traspasar el integumento del pez (Ormonde y col 2000). Luego de un desafío con *V. anguillarum* por inmersión en trucha arcoiris (*O. mykiss*), la bacteria pudo ser detectada en piel y aletas (Spanggaard y col 2000). Además, utilizando técnicas histopatológicas se encontró que esta bacteria en infecciones naturales y experimentales de ayu (*P. altivelis*) el primer tejido que colonizaba era la piel (Kanno y col 1989). Experimentalmente se ha establecido, que la piel es colonizada antes de las 12 h de inmersión en un cultivo virulento con *Vibrio spp*. A esto, le sigue la invasión de hígado, bazo, músculo, branquias e intestino (Austin y Austin 1999).

En este trabajo, la tercera vía que resultó ser exitosa para reproducir la Vibriosis, fue la vía baño o por inmersión, en la cual se logró un 20% de mortalidad acumulada. La mortalidad se inició el día 10 y cesó el día 17 post inoculación. Cabe destacar que en el grupo 8 de esta vía, se produjo una mortalidad inespecífica de 28 peces entre los días 19 y 20 post inoculación, producto de una falla en el filtro del acuario.

El menor porcentaje de mortalidad acumulada específica en comparación a las dos vías descritas anteriormente se podría explicar porque al realizarse el desafío por esta vía es muy difícil que todos los peces hayan recibido la misma dosis bacteriana y no se puede determinar

la dosis exacta individual. Este resultado concuerda con un desafío realizado a través de la vía baño durante 45 minutos con *V. ordalii* en salmón del atlántico (*S. salar*) de 30 g, logrando cerca de 50 % de mortalidad acumulada el día 35 post inoculación*. Otro desafío realizado por esta vía en salmón del atlántico (*S. salar*) con *V. anguillarum*, logró un 80 a 100 % de mortalidad en los salmones desafiados con una dosis de 1 a $2,5 \times 10^5$ ufc/ml (Austin y Austin 1999). En 1989 (Kanno y col) mediante desafíos por inmersión en ayu (*P. altivelis*) con *V. anguillarum* logró mortalidades de 30 a 100 %, con una LD₅₀ de 1×10^4 ufc/ml. Otro desafío realizado con *V. anguillarum* por inmersión, pero en trucha arcoiris (*O. mykiss*) con una dosis de 10^6 ufc/ 0,1 ml, generó una mortalidad del 100 % a las 96 h post inmersión. El porcentaje de mortalidad acumulada obtenido vía baño (20 %) en este trabajo, es menor que los resultados de los desafíos descritos en la bibliografía. Es difícil poder explicar esta diferencia, ya que los experimentos señalados, fueron realizados en otras especies de peces o con otra especie de *Vibrio*, por lo cual se hace más aún difícil comparar. Se puede señalar que en Chile, esta vía también fue exitosa para reproducir la enfermedad causada por *P. salmonis* en trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Pizarro 1998, Ojeda 2000).

El tiempo de inmersión (1 hora) utilizado en este trabajo coincide con los utilizados en otros desafíos con *V. anguillarum* (Austin y Austin 1999, Spanggaard y col 2000), *A. salmonicida* (Quinteros 2004), U2 (Brossard 1999), *P. salmonis* (Ojeda 2000). En cambio, es mayor a los 5 minutos empleados por Kanno y col (1989) con *V. anguillarum*. Durante la inmersión de los peces, éstos se mantuvieron con aireación constante y la temperatura de la suspensión bacteriana en este trabajo fue 13,7 °C, mientras que en otros desafíos con *V. anguillarum* fue 10 a 15 °C (Austin y Austin 1999), 12 °C (Spanggaard y col 2000) y para *P. salmonis* fue 16 °C (Pérez 1996) y 17,5 +/- 0,5 °C (Ojeda 2000).

Es importante destacar, que en este trabajo el desafío vía baño se realizó con la piel intacta de los peces, es decir, sin causar previo al desafío algún corte o raspado de piel. Se hizo de esta forma con el propósito de simular lo mejor posible la situación natural de invasión bacteriana. Las publicaciones sobre invasión bacteriana por piel intacta son escasas. La primera infección experimental descrita en piel intacta fue hecha por Kanno y col (1989) en ayu (*P. altivelis*) mediante un trozo de papel embebido en una suspensión bacteriana con *V. anguillarum*. En este mismo desafío, se observó que si previo al experimento se les provocaba a los peces soluciones de continuidad como escarificaciones en la piel o cortes en las aletas, los porcentajes de mortalidad acumulada eran mayores que las obtenidas en el desafío con peces intactos. Otro factor a tomar en cuenta, es que en los salmones cultivados, existen frecuentemente lesiones microscópicas a las cuales se adhieren los microorganismos (Estay 2003).

* Comunicación personal K. Gravningen y col, Laboratorio Alparma, 2004.

Una de las posibles rutas de ingreso bacteriano en peces, corresponde al tracto gastrointestinal (GI). Al respecto se han llevado a cabo distintos estudios a fin de determinar con exactitud el rol que juega la vía digestiva en el ingreso de determinados agentes patógenos. Por otra parte, el tracto GI es un tejido cuya membrana mucosa, con función digestiva crea un ambiente extremadamente hostil para potenciales patógenos. En el caso específico de peces carnívoros, el medio gástrico se caracteriza por tener pH ácido, que varía entre 2 a 4 y por secretar enzimas digestivas. En cambio, a nivel intestinal la digestión de proteínas se realiza en un medio alcalino (Roberts 1989). En un estudio realizado en turbot (*S. maximus*), se determinó que después tres horas de la alimentación el contenido estomacal tenía un pH entre 4,8 a 5,3 y que después de diez horas el pH bajaba a 3,9 a 4,5. Mientras que el pH del intestino variaba entre 7,4 y 7,9 y el del recto entre 7,6 a 8,5 (Olson y col 1998).

La importancia de estudiar la participación de la vía oral en el ingreso de *V. ordalii*, radica en la posibilidad de determinar la capacidad de dicha bacteria de sobrepasar las barreras mucosas y enzimáticas del tracto digestivo, colonizándolo y estableciendo un estado de infección. A través de esta vía, no fue posible reproducir la Vibriosis. No hubo mortalidad en los grupos 5 y 6 de salmón del atlántico (*S. salar*) inoculados por esta vía, como tampoco presentaron signología clínica de la enfermedad. Esto sugiere que el ingreso de esta bacteria por vía gástrica en condiciones naturales sería de baja probabilidad. Al final del período de desafío tampoco se pudo reaislar *V. ordalii* a partir de los peces sobrevivientes de esta vía. Las causas del fracaso de la reproducción de la enfermedad por la vía oral, pueden ser diversas, por una parte la susceptibilidad de *V. ordalii* al pH estomacal, también la existencia de enzimas gástricas que pueden causar la inactivación o destrucción de la bacteria en forma total o parcial (Rombout y col 1986, Roberts 1989). Además se debe tomar en cuenta factores como la rapidez de la evacuación gástrica y del tránsito intestinal (Vigneulle y Baudin-Laurencin 1991). Estudios realizados en nuestro país con otras bacterias, a través de esta vía tampoco fueron exitosos para *A. salmonicida* (Quinteros 2004) ni para *U2* (Brossard 1999). Sin embargo, lo fue para *P. salmonis* (Pizarro 1998).

Se ha demostrado que el tracto GI de trucha arcoiris (*O. mykiss*) puede servir como puerta de entrada para *V. anguillarum*. Adicionalmente, este tracto parece ser el sitio de colonización y de amplificación para especies de *Vibrios* patógenos. Además se mostró que el intestino de turbot (*S. maximus*) puede servir de puerta de entrada para *V. anguillarum*, cuando éste es administrado por intubación gástrica o anal. Esto indica que esta bacteria puede pasar por el tracto GI y sobrevivir a los ácidos estomacales, bilis y enzimas digestivas. Esto se reafirma con el hallazgo de *V. anguillarum* en el material fecal de peces desafiados (Olsson y col 1998). Esto concuerda con los hallazgos de *V. ordalii* y *V. anguillarum* en los ciegos pilóricos y tracto GI de salmónes del pacífico infectados de Vibriosis (Ransom y col 1984).

Las paredes del tracto GI contienen células epiteliales que constantemente producen mucus, el cual contiene proteínas, lípidos, glicoproteínas y glicolípidos. De esta forma, este mucus puede ser una fuente de nutrientes para los microorganismos, incluyendo a *V.*

anguillarum. Esto se comprueba con el rápido y eficiente crecimiento que mostró esta bacteria en el mucus intestinal de salmonídeos (García y col 1997). En contraposición a esto, estudios in vitro sobre esta bacteria, muestran que la secreción intestinal (especialmente de los ciegos pilóricos e intestino medio) degradan eficientemente a *V. anguillarum* dentro de 30 minutos (Spanggaard y col 2000)

Kanno y col (1989), lograron reproducir la Vibriosis en turbot (*S. maximus*) mediante intubación gástrica y anal. La mortalidad acumulada causada por la introducción del patógeno dentro del estómago (70 %) fue menor que al efectuar el ensayo en forma intra-anal (85 %). Además se determinó que sólo con la dosis bacteriana más alta (6×10^8 ufc/pez) se producían mortalidades en los peces desafiados mediante intubación gástrica. En la carpa común (*Cyprinus carpio*) se comprobó que después de algunas horas de la administración por intubación intrainestinal de *V. anguillarum*, éstos se encontraban en macrófagos intraepiteliales del intestino posterior. En este ensayo también se determinó, que el proceso de absorción GI sería rápido, ya que comenzaría 1 hora después de la intubación anal (Rombout y col 1986).

Respecto al volumen del inóculo utilizado en la vía oral, éste fue 0,2 ml, lo que concuerda con los utilizados por Pizarro (1998) y Quinteros (2004). Kanno y col (1989) en su estudio realizado con *V. anguillarum* utilizó un volumen de 0,05 ml tanto en la intubación oral como en la anal. Esto implicó que cada pez recibió una dosis bacteriana de 6×10^8 ufc/pez, dosis superior a la utilizada en este trabajo ($1,14 \times 10^7$ ufc/pez).

Factores ambientales como temperatura y salinidad, son muy importantes para la quimiotaxis y la adhesión de *V. anguillarum*. En un estudio realizado en brema marina (*Sparus aurata*), se determinó que aumento de los valores de temperatura y salinidad ambientales, producen el incremento del número de células de *V. anguillarum* adheridas a branquias, mucus intestinal y piel. También se observó, que a una temperatura de 15 °C y a una salinidad de 10‰ (similares a la temperatura y salinidad utilizadas en este trabajo), el mayor número de células de *V. anguillarum* se encontraban adheridas al mucus intestinal (Bordas y col 2003).

En cuanto a la signología clínica que presentaron los peces, los tres signos más frecuentes y comunes para las vías IM, IP y baño, fueron: exoftalmia uni/bilateral, hígado pálido y friable, y bazo friable y esplenomegalia. Por otra parte se puede indicar que, la hemorragia bucal, ocular, en la base de las aletas, en poro urogenital, en intestino posterior y exoftalmia descritas en este trabajo, coinciden con otras investigaciones (Post 1983, Austin y Austin 1999, Plumb 1999, Godoy 2004). Por otra parte, la esplenomegalia, hígado pálido, coinciden con los signos mencionados por Godoy (2004).

El reaislamiento de la bacteria inoculada se realizó a través del cultivo de muestras de riñón de peces moribundos en Agar TSA al 1 % de NaCl a 22-23 °C por siete días. La confirmación del agente se realizó por medio de un Test de aglutinación rápida (Mono-Va[®]), ya que *V. ordalii* posee antigenicidad cruzada con *V. anguillarum* y por un test de sensibilidad al agente vibriostático O/129 (Oxoid[®]). Este tipo de diagnóstico coincide con lo descrito por American Fisheries Society (1992), Godoy (2004) y Quinteros (2004). También se realizaron pruebas bioquímicas, las que en conjunto con las pruebas diagnósticas, permiten demostrar que la bacteria reaislada a partir de los peces inoculados, es la misma que fue inoculada

Con relación a los resultados del análisis histopatológico obtenidos en este trabajo, se puede señalar que en las muestras de tejido renal, los hallazgos histopatológicos más frecuentes fueron la proliferación de células melanomacrofágicas y la nefritis. Ambas lesiones se encontraron en todas las muestras analizadas, lo cual indica que no hubo variación para éstas, según la Vía de Inoculación. Por otra parte, se observaron bacterias en glomérulos en dos de las seis muestras analizadas. El riñón es un órgano blanco para muchas enfermedades. Bacteremias agudas pueden ser causadas por *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.* (Roberts 2001). Este órgano posee un componente hematopoyético y otro excretor, la presencia de tejido hematopoyético en el intersticio, puede complicar la interpretación de los cambios inflamatorios, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad. Las células melanomacrofágicas son macrófagos que contienen pigmentos oscuros, especialmente melanina. El número, tamaño y apariencia histológica, varía según la edad, estado nutricional y exposición a antígenos. Es así que su número y tamaño puede aumentar en peces crónicamente enfermos, cuando el catabolismo ha sido excesivo (Ferguson 1989). En el caso de esta investigación, la proliferación de células melanomacrofágicas y la presencia de un proceso inflamatorio en el riñón, indica que el órgano está enfrentándose a la acción de *V. ordalii*. Por otra parte, el infiltrado perivascular señala que el agente llegó al órgano a través de la vía sanguínea.

El examen histopatológico del tejido hepático, señala que el hallazgo más común de este órgano fue la perivascularitis necrotizante con edema. Esta lesión se presentó en todas las muestras, siendo moderada en las de la vía IP, mientras que en el resto de las muestras, sólo fue leve. Esta diferencia se podría explicar por la ubicación anatómica del hígado, ya que se encuentra a nivel del abdomen anterior y de este modo mediante la inoculación de *V. ordalii* vía IP, la bacteria llega directamente a la cavidad abdominal y de esta forma también al hígado. En cuanto a la causa de procesos inflamatorios a nivel hepático, se describen a agentes bacterianos como *V. anguillarum*, *R. salmoninarum* y *Nocardia asteroides* (Roberts 2001). La perivascularitis necrotizante con edema, indica que el agente responsable del cuadro inflamatorio, en este caso *V. ordalii*, se distribuyó vía sanguínea. En la atrofia hepática, hay una disminución del citoplasma de las células del parénquima, originando un menor tamaño del órgano, esto puede ser causado por enfermedades nutricionales, edad avanzada o cuadros de inanición (Ferguson 1989). En el caso de este trabajo, la atrofia hepática se puede explicar por el período de inanición que sufrieron los peces desafiados, ya que previo y posterior al

traslado de los peces a Valdivia, éstos fueron sometidos a ayuno con el fin de lograr su aclimatación y reducir el estrés.

De los resultados del análisis histopatológico del bazo, se puede señalar que el hallazgo más frecuente fue la proliferación de células reticulares, la cual fue severa y se presentó en todas las muestras, sin diferencias entre vías de inoculación. Además se detectó la presencia de bacterias, en cuatro de las seis muestras analizadas. Las células reticulares, dan origen a las fibras reticulares, las cuales se especializan en atrapar complejos inmunes y antígenos particulados (Roberts 2001). Es por esta razón que en ausencia de nódulos linfáticos, el bazo de los teleósteos representa uno de los mayores filtros del sistema vascular, removiendo los antígenos circulantes. Por lo tanto, cualquier infección sistémica compromete al bazo en algún grado (Ferguson 1989). La proliferación de células reticulares, indica que el órgano estuvo contacto con un microorganismo y que está respondiendo al proceso infeccioso, en este caso provocado por la inoculación de *V. ordalii*.

En el análisis histopatológico del corazón, la alteración más frecuente fue la epicarditis focal. Adicional a esto, se observaron bacterias en tres de las seis muestras analizadas. El epicardio es un sitio común para lesiones, asociadas con parásitos o agentes microbianos. Para que haya epicarditis, el agente causal debe llegar directamente vía traumática o vía sanguínea como probablemente ocurrió en este caso, produciendo un proceso inflamatorio.

A partir del análisis histopatológico de las muestras, se puede concluir que los órganos que presentaban mayores alteraciones fueron riñón y bazo.

En infecciones naturalmente adquiridas por *V. ordalii* en salmón chum (*O. keta*), las bacterias se observaron con mayor frecuencia en músculo y piel, presentándose necrosis cuando están fuertemente infectados. La distribución de las colonias de *V. ordalii* no es uniforme entre los tejidos infectados, observándose en muchas áreas de la piel, tanto epidermis como hipodermis, así como branquias, bazo, hígado y en la musculatura adyacente al riñón, sin embargo la bacteria no pudo ser observada en este último órgano (Ransom y col 1984). A diferencia de los resultados de este trabajo, en el cual fue posible observar la bacteria en glomérulos en dos de las muestras analizadas. Por otra parte, los mismos autores infectaron artificialmente salmón chum (*O. keta*), encontrando que la piel y músculo son ampliamente colonizados. También se observaron más colonias bacterianas en hígado y bazo en comparación con infecciones naturales. La histopatología de Vibriosis observada en salmón coho (*O. kisutch*) y en salmón chinook (*O. tshawytscha*), es básicamente la misma que se describió para salmón chum (*O. keta*). Esto indica la posibilidad que otras especies de salmonídeos como salmón del atlántico (*S. salar*) reaccionen a la infección de igual forma.

Las infecciones experimentales obtenidas a través de las vías IM, IP y baño, a través de las cuales se reprodujo la Vibriosis, constituyen un aporte de importancia para la salmonicultura nacional. Ya que otorgan información acerca de la puerta de entrada de la cepa chilena de *V. ordalii* y de la patogenia de la enfermedad. La aplicación de estas tres vías podría ser usada para evaluar el grado de virulencia de otras cepas de esta bacteria y determinar la eficacia de vacunas para la prevención de Vibriosis, entre otras enfermedades. Sin embargo, las condiciones en que se hacen los desafíos por estas vías: IM, IP y baño requieren ser estandarizadas, para determinar la factibilidad de utilizar menores concentraciones bacterianas, disminuir al máximo el estrés de los peces, la salinidad óptima del agua de los acuarios, tiempo de inmersión adecuado, etc. De este modo, este es el primer paso para futuras investigaciones sobre vías de inoculación de *V. ordalii* en salmonicultura.

CONCLUSIONES

La Vibriosis puede ser reproducida en salmón del atlántico (*S salar*) de 15 a 20 g, mediante la inoculación experimental de un aislado chileno de *V. ordalii*, a través de las vías intramuscular, intraperitoneal y baño bajo las condiciones de este estudio. Además se pudo reaislar la bacteria inoculada a partir de todos los peces moribundos de Vibriosis.

A través de la inoculación experimental vía oral de un aislado chileno de *Vibrio ordalii*, en salmón del atlántico (*Salmo salar*) de 15 a 20 g, no se logró reproducir la Vibriosis bajo las condiciones de este estudio.

El mayor porcentaje de mortalidad acumulada específica (100 %) se logró a través de la inoculación de *Vibrio ordalii* en salmón del atlántico (*Salmo salar*) por la vía intramuscular. En la vía intraperitoneal se obtuvo un 65 % de mortalidad acumulada específica, mientras que a través de la vía baño se obtuvo un 18,3 % de mortalidad acumulada específica.

Los signos clínicos más frecuentes entre los peces con Vibriosis fueron hígado pálido y friable, exoftalmia uni/bilateral y bazo friable con esplenomegalia. Por otra parte, los órganos que presentaron más hallazgos histopatológicos de Vibriosis fueron riñón y bazo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. 1999. Fish disease and Disorders, Volumen 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Eds. P.T.K Woo and Bruno. Estados Unidos.

Amend DF. 1981. Potency testing of fish vaccines. International Symposium in Fish Biologics: Serodiagnostic and Vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 49: 447-454.

American Fisheries Society. Fish Health Section, Fish Health Blue Book. 1992. Procedimientos para la detección e identificación de ciertos patógenos de los peces. Traductor Alejandro E. Del Valle. Capítulo 16. Versión en español editada por Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Argentina.

Austin B, Austin DA. 1999. Bacterial fish pathogens: Diseases in Farmed and Wild fish. Third edition. Ed. Praxis. Cornwall, Inglaterra.

Baumann P, Furniss AL, Lee JV. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore-London.

Bergljót M, Slavko H. 2000. The susceptibility and immune response of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* infected cod, *Gadus morhua* L. N°7. En : Quinteros VL. 2004. Inducción experimental de la Furunculosis en salmón del atlántico (*Salmo salar*) con *Aeromona salmonicida* subsp. *Achromogenes* a través de diferentes vías de inoculación. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Bordas MA, Balebona MC, Chabrilón M, Rodríguez- Maroto JM, Moriño MA. 2003. Influence of temperature and salinity on the adhesion to mucous surfaces of gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) of pathogenic strains of *Vibrio alginolyticus* and *Listonella anguillarum*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 23(6): 273-280.

Brossard MA. 1999. Determinación experimental de la vía de contagio del agente U2 (RLO) aislado de Puye (*Galaxias maculatus*) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis, M. V, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile

Carvajal J, González L, Teuber C, Gebauer M, Poblete T, Riffarty G, Donoso T. 1989. Patologías observadas durante 1989 en salmonideos en cultivo en la X Región. IX Jornadas de Ciencias del Mar. Antofagasta, Octubre 1989.

Colquhoun DJ, Aase IL, Wallace C, Baklien A, Gravningen K. 2004. First description of *Vibrio ordalii* from Chile. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 24 (4): 185-188.

Egidius E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A Review. *Aquaculture* 67: 15-28.

Estay D. 2003. Supervivencia de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) desafiados con *Piscirickettsia salmonis* usando diferentes vías de inoculación. Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Evelyn TP. 1996. Infection and diseases. The Immune System: Organism, Pathogen and environment. Edited by Iwama, J and Nakanishi, T. Academic Press. San Diego.

Ferguson HW. 1989. Systematic Pathology of Fish. First Edition. Iowa State University Press. Iowa, Canadá.

García T, Otto K, Kjelleberg S, Nelson DR. 1997. Grow of *Vibrio anguillarum* in Salmon Intestinal Mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (3): 1034-1039.

Godoy M. 2004. Salmónidos afectados por Vibriosis en Chile. *Aquanoticias* 91: 88-91.

González ED. 2002. Descripción de la Furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie *salmonicida* en salmón del atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Holt JG, Kreig NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. 2000. Bergey's Manual of Determinative bacteriology . Ninth Edition. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Estados Unidos.

Infante R. 2004. Estado actual y perspectivas de la salmonicultura en Chile. Simposium: Situación Actual de la Salmonicultura y Perspectivas Futuras frente a los TLC. *XIII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria*, Valdivia.

Inglis V, Bromage NR, Roberts RJ. 1993. Bacterial disease of fish. Chapter 6. Ed. New York: Institute of Aquaculture. Halsted Press, New York, Estados Unidos.

Kanno T, Nakai T, Muroga K. 1989. Mode of Transmission of Vibriosis among Ayu *Plecoglossus altivelis*. *J. Aquat. Anim. Health* 1: 2-6.

Larsen JL, Mellergaard S. 1984. Agglutination Typing of *Vibrio anguillarum* Isolates from Diseased Fish and from the Environment. *Appl. Environl. Microbiol.* 47(6):1261-1265.

Lozano ML. 2000. Compendio y Directorio de la Acuicultura y la Pesca de Chile 2000. Ed. Fundación Chile. Pp 19-58.

Luna L. 1968. Manual of histologic staining methods. Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. Ed. Mc. Graw- Hill. Toronto, Canadá.

Mendez R, Vidal L. 1994. La salmonicultura chilena durante 1993. *Aquanoticias internacional* 20:24-39.

Muñoz JC. 1990. Examen microbiológico en salmonideos de cultivo de la X° Región para el intento de aislamiento de *Vibrio sp.* y otros agentes bacterianos. *Tesis, M.V.*, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

Nelson JS, Rohovec JS, Fryer JL. 1985. Location of *Vibrio anguillarum* in tissues of infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using the fluorescent antibody technique. *Fish Pathol.* 20: 229-235.

Norambuena R. 2004. Simposium: Situación Actual de la Salmonicultura y Perspectivas Futuras frente a los TLC. *XIII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria*, Valdivia.

Ojeda PA. 2000. Estudio de piel y branquias como vías de ingreso de *Piscirickettsia salmonis* y evaluación de métodos de desafío experimental para trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Tesis, M.V.* Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Olson JC, Joborn A, Westerdahl A, Blomberg L, Kjelleberg S, Conway PL. 1998. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. *J. Fish Dis.* 21: 1-9.

Organización Internacional de Epizootias (O.I.E.). 2003. Diagnostic Manual of aquatic animal diseases. Forth ed. Paris, Francia

Ormonde P, Horstedt P, O'Toole R, Milton DL. 2000. Role of Motility in Adherence to and Invasion of a fish Cell Line by *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 182(8): 2326-2328.

Pérez BA. 1996. Desafío experimental en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con *Piscirickettsia salmonis* usando tres esquemas de inoculación. Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Pizarro P. 1998. Evaluación de la vía gastrointestinal como ruta de ingreso de *Piscirickettsia salmonis* y evaluación de métodos de reproducción experimental de Piscirickettsiosis en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Post G. 1983. Textbook of fish Health. TFH Publications. New Jersey, USA.

Plumb JA. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University.

Quinteros VL. 2004. Inducción experimental de la Furunculosis en salmón del atlántico (*Salmo salar*) con *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes* a través de diferentes vías de inoculación. Memoria de titulación, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Ransom DP, Lannan CN, Rohovec JS, Fryer JL. 1984 Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *J. Fish Dis.* 7: 107-115.

Roberts RJ. 1981. Patología de los peces. Ed. Mundi- Prensa. Madrid, España.

Roberts RJ. 1989. Fish Pathology- The Bacteriology of Teleosts. Ed. Bailliére Tindall 2nd edition, London, England.

Roberts RJ. 2001. Fish Pathology- The Bacteriology of Teleosts. Ed. Baillieré Tindall 3rd edition, London, England.

Robohm RA, Koch RA. 1995. Evidence for oral ingestion as the principal of antigen entry in bath immunized fish. *Fish Shellfish Immunol.* 5:137-150. En: Pizarro P. 1998. Evaluación de la vía gastrointestinal como ruta de ingreso de *Piscirickettsia salmonis* y evaluación de métodos de reproducción experimental de Piscirickettsiosis en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis, M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Rombout JH, Block LJ, Lamers CH, Egberts E. 1986. Immunization of carp (*Cyprinus carpio*) with a *Vibrio anguillarum* bacterium: indications for a common mucosal immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 10: 341-351.

Schafer M, Alvarado V, Enriquez R, Monras M. 1990. The Coho salmon Sindrom (CSS): a new disease in Chilean salmon reared in sea water. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 10:130.

Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Gram L. 2000. Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 23: 423-427.

Schiewe MH, Trevor JT, Crosa JH. 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a Causative Agent of Vibriosis in Fish. *Current Microbiology* 6: 343-348.

Teuber M, Vial MV, Poblete T, Donoso T, Gebauer MT, Riffarti G. 1989. Hallazgos de *Vibrio anguillarum* en aguas marinas del Sur de Chile. IX Jornadas de Ciencias del Mar. Antofagasta, Octubre 1989.

Vigneulle M, Baudin-Laurencin F. 1991. Uptake of *Vibrio anguillarum* bacterin in the posterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Dicentrarchus labrax* and turbot *Scophthalmus maximus* after oral administration or anal intubation. *Dis. Aquat. Org.* 11: 85-92.

8. ANEXOS

Anexo 1: Materiales utilizados en la Sala de acuarios y en el Laboratorio.

Sala de acuarios:

- 10 acuarios de fibra de vidrio con tapa, cada uno con capacidad de 80 l.
- 10 coladores de plástico.
- 10 filtros recirculación con carbón activado y perlón.
- 20 difusores de aire.
- 10 termómetros.
- 10 calefactores.
- Sistema de termostato.
- Material de aseo y desinfección.
- Alimento extruído comercial para los peces.
- Sistema eléctrico de emergencia.
- Bomba de extracción de agua.
- Botas de goma, pechera plástica y delantal.
- Baldes, tambores, manguera de plástico.
- Densímetro.
- Probeta de 1000 ml.

Laboratorio:

- Material de disección y guantes de látex.
- Bandeja para realizar la disección.
- Mechero, asa de cultivo, portaobjetos.
- Probetas, vasos precipitados y matraces.
- Placas petri estériles.
- Agar Soya Tripticasa (TSA) y Cloruro de sodio (NaCl) Merck^{® 5}.
- Agua destilada.
- Colorantes para tinción de Gram.
- Colorantes para tinción de Giemsa.
- Formalina tamponada al 10%.
- PBS pH 7,2.
- Alcohol al 95% y al 70%.
- Aceite de inmersión.
- Hipoclorito de sodio.

⁵ Merck Química Chilena Ltda. Francisco de Paula Taforó # 1981. Santiago - Chile.

- Incubadores, refrigerador, cámara de bioseguridad, microscopio óptico, autoclave.
- Jeringas de tuberculina y sonda plástica
- Toalla de papel.
- Material para realizar las pruebas bioquímicas.
- Test de aglutinación rápida, Mono Va^{®6}.
- Test de sensibilidad al vibriostático O/129, Oxoid^{®7}

⁶ Bionor Skien- Norway.

⁷ P.V. Equip Ltda. Los Capitanes 1388 Providencia, Santiago-Chile.

Anexo 2: Mortalidad diaria total en *S. salar* (15-20 g), inoculados vía intraperitoneal, intramuscular, oral y baño con *V. ordalii*, mantenidos a una T° promedio de 14,3 °C y una salinidad de 10 ‰.

Días post inoculación	MORTALIDAD DIARIA TOTAL							
	Vía Intraperitoneal		Vía Intramuscular		Vía Oral		Vía Baño	
	grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4	grupo 5	grupo 6	grupo 7	grupo 8
1 a 4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	6	1	-	-	-	-
6	4	1	16	19	-	-	-	-
7	11	3	8	6	-	-	-	-
8	1	4	-	3	-	-	-	-
9	1	1	-	1	-	-	-	-
10		3	-	-	-	-	5	-
11	1	4	-	-	-	-		-
12	3	2	-	-	-	-	1	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	1	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	1	1
16	-	1	-	-	-	-	1	1
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1	-	-	-	-	-	1	-
19	-	-	-	-	-	-	-	17
20	-	-	-	-	-	-	-	11
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	1	-
24 a 30	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Ausencia de mortalidad.

Anexo 3: Registro diario de temperatura (AM y PM) del agua de los acuarios de los *Salmo salar* desafiados con *Vibrio ordalii* a través de cuatro vías de inoculación y mantenidos a una salinidad de 10 ‰.

Días post inoculación	Temperatura (°C)		Temperatura promedio día
	AM	PM	
1	15	15,5	15,25
2	14,5	15	14,75
3	14,5	15	14,75
4	14	15	14,5
5	15	16	15,5
6	14	14	14
7	15	15	15
8	13	14	13,5
9	13	14	13,5
10	14	15,5	14,75
11	14	15	14,5
12	14,5	15	14,75
13	15	15	15
14	13	14	13,5
15	12	13	12,5
16	13	15	14
17	15	16	15,5
18	15	17	16
19	15	16	15,5
20	15	16	15,5
21	14,5	14,5	14,5
22	14	14,5	14,25
23	13,5	15	14,25
24	14	14,5	14,25
25	13,5	14	13,75
26	13	14	13,5
27	12	13	12,5
28	13	14	13,5
29	13	14	13,5
30	13,5	15	14,25

Anexo 5: Descripción bioquímica de *V. ordalii* aislado en Chile desde salmón del atlántico (*S. Salar*)

Pruebas Bioquímicas	Vía Intraperitoneal	Vía Intramuscular	Vía Baño
Oxidasa	+	+	+
O/F	(+ / +)	(+ / +)	(+ / +)
Citrato	-	-	-
VP	-	-	-
Lisina	-	-	-
Ornitina	-	-	-
Arginina	-	-	-
ONPG	-	-	-
Gelatina	-	-	-
Nitrato	+	+	+
Motilidad	+	+	+
Indol	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Trehalosa	+	+	+
Xilosa	-	-	-
Manitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Celobiosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Sacarosa	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Glucosa (gas)	-	-	-
Salicina	-	-	-
Rojo Metilo	+	+	+
Esculina	-	-	-

O/F: Oxidación/Fermentación.

VP: Voges Proskauer.

ONPG: o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido.

9. AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Ricardo Enríquez, Sra. Mónica Monrás, Dra. Vania Quinteros, Sr. Esteban Henríquez y Dr. Enrique Paredes, por la ayuda y conocimientos entregados durante el desarrollo de este trabajo.
- A mi familia y amigos por su cariño y apoyo constante.
- A Gino por su ánimo, apoyo, disposición y cariño incondicional.