

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

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL A TRAVÉS DE DIFERENTES VÍAS DE *Vibrio ordalii* AISLADO EN CHILE EN TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

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

LUIS EDUARDO ALMONACID LORCA

VALDIVIA – CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Ricardo Enríquez

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Jorge Toro

Nombre

Firma

Santiago Ernst

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

21 de Septiembre de 2006

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSIÓN.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	29
8. ANEXOS.....	34
9. AGRADECIMIENTOS.....	37

A mis padres, a mi Papi...

1. RESUMEN

Con el objetivo de reproducir experimentalmente vibriosis con un aislado nacional de *V. ordalii* “atípico”, se obtuvieron alevines de 70-90 g de trucha arco iris (*O. mykiss*) de una piscicultura sin antecedentes de vibriosis. Los peces fueron aclimatados durante una semana, período en el cual fueron chequeados sanitariamente según el protocolo del Manual de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos (O.I.E 2003).

La cepa de *V. ordalii* “atípico” denominada R 157 proveniente de un brote en el sur de Chile en salmón del Atlántico (*S. salar*) y que era mantenida en el cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile fue descongelada e inoculada en peces de 70-90 gramos para recuperar la patogenicidad de la bacteria. Este proceso fue repetido dos veces.

Se utilizaron cuatro esquemas de inoculación: parche cutáneo ($5,7 \times 10^8$ ufc/ml), intramuscular e intraperitoneal ($5,7 \times 10^8$ ufc/ml) e inmersión ($1,47 \times 10^5$ ufc/ml) en grupos de 15 peces por cada vía en duplicado. Los peces controles fueron inoculados por las vías intraperitoneal e intramuscular con una solución salina peptonada. Tras la inoculación los peces fueron mantenidos en acuarios de 80 l de agua a una temperatura promedio de $17,5^\circ \text{C}$ y una salinidad de 17‰ durante 30 días. Siendo revisados los acuarios diariamente retirándose los peces muertos y/o moribundos para ser chequeados sanitariamente.

Se logró reproducir la vibriosis a través de las cuatro vías siendo las mortalidades acumuladas del 43,33% para la vía inmersión, 23,33% para la vía intramuscular y 3,33% para las vías intraperitoneal y parche cutáneo. Los signos clínicos presentados con mayor frecuencia fueron: esplenomegalia y bazo friable, exoftalmia uni/bilateral, enteritis y descamación de la piel. Pudiendo ser reaislada la bacteria inoculada de todos los peces muertos y/o moribundos utilizando agar TSA con 2% de NaCl.

Se concluye que bajo las condiciones de éste experimento la vibriosis puede ser reproducida en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g, a través de la inoculación de un aislado nacional de *V. ordalii* por la vías parche cutáneo, intraperitoneal, intramuscular e inmersión.

Palabras clave: inoculación experimental, vibriosis, *V. ordalii*, trucha arco iris (*O. mykiss*).

2. SUMMARY

EXPERIMENTAL INOCULATION OF RAINBOW TROUT (*O. mykiss*) WITH A CHILEAN ISOLATE OF *Vibrio ordalii* BY SKYN PATCH, INTRAPERITONEAL, INTRAMUSCULAR AND IMMERSION ROUTES.

In order to reproduce experimentally vibriosis with a Chilean isolate of *V. ordalii* in the rainbow trout (*O. mykiss*) fingerlings of 70-90g were obtained from a fish farm free of Vibriosis. The fishes were acclimatated during a week, period on they were sanitary checked according to the protocol of the Diagnostic Manual of Aquatic Animal Diseases (OIE 2003). The *V. ordalii* strain was obtained from the stock of the Laboratory of Ictiopathology of the Universidad Austral de Chile.

Four inoculation schemes were used: skin patch ($5,7 \times 10^8$ cfu/ml), intramuscular ($5,7 \times 10^8$ cfu/ml), intraperitoneal ($5,7 \times 10^8$ cfu/ml) and immersion ($1,47 \times 10^5$ cfu/ml), in groups of 15 fish on each inoculation way on duplicated. The control fish were inoculated in intraperitoneal and intramuscular ways with a peptonated saline solution. After the inoculation process the fishes were keep in 80 l water tanks with a average temperature of 17,5° C and water with a salt concentration of 17⁰/₀₀ for 30 days. During those days the water tanks were checked every day. The dead or dying fishes were removed and submitted to sanitary controls.

The Vibriosis was successfully reproduced in the four ways of inoculation. The success of the result change according to the way of inoculation. We collected an accumulated mortality of 43,33% in the immersion way, a 23,33% for the intramuscular way, a 3,33% for the intraperitoneal and skin patch ways. The most frequently clinical sings were: enlargement of the spleen, exophthalmia uni/bilateral, enteritis and skin desquamation. The inoculated bacteria was reisolated from dead or dying fishes using TSA agar with 2% of NaCl.

In conclusion, under the laboratory condition of this experiment the vibriosis could be reproduce in rainbow trout (*O. mykiss*) (70-90g) trough the inoculation of an isolated native of *V. ordalii* trough many ways including skin patch, intraperitoneal, intramuscular and immersion.

Key words: experimental inoculation, vibriosis, *V. ordalii*, rainbow trout (*O. mykiss*).

3. INTRODUCCIÓN

La producción nacional de salmónidos está concentrada en el llamado: “Cinturón del Salmón” que se ubica entre las regiones X y XII, área geográfica que cuenta con las condiciones óptimas para su cultivo. La X Región cobija la mayor parte del cultivo de truchas y salmones en Chile, el que ha presentado un aumento de 250 veces su producción entre los años 1987 y 2002 (Salmón Chile 2003).

Las altas densidades de los salmones en los centros de cultivo han condicionado la aparición de enfermedades infectocontagiosas masivas, debido a la escasa distancia existente entre los individuos, disminuyendo el tiempo de exposición de los patógenos a condiciones medioambientales desfavorables (Kinkelin 1985, Stephen e Iwama 1997, Eng y Tech 2002).

La expresión de una enfermedad es el resultado de interacciones entre el hospedador, el patógeno y el medio ambiente. Se debe considerar que en estas interacciones los principales factores que influyen en la aparición de enfermedades son la edad, el estado sanitario, la exposición a patógenos y las condiciones de cultivo (Stephen e Iwama 1997). Pudiendo actuar finalmente los microorganismos como patógenos primarios, secundarios o invasores oportunistas (Roberts 2001). Presentándose altas mortalidades en peces de vida libre como en cautiverio especialmente por enfermedades provocadas por microorganismos bacterianos Gram negativos (Actis y col 1999).

Vibriosis es una enfermedad bacteriana sistémica, producida por bacterias de la familia **Vibrionaceae** del género *Vibrio* (Holt y col 2000); que afecta a peces marinos, de estuario y en ocasiones a peces de agua dulce (Post 1983, Godoy 2004). Ha sido reportada a nivel mundial, generando grandes epidemias en salmónidos cultivados en el hemisferio norte provocando altas mortalidades (Reed y Francis-Floyd 1996, Roberts 2001).

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos Gram negativos rectos o curvos de 0,3-0,5 μm x 1,4-2,6 μm , siendo todas anaerobias facultativas (Inglis y col 1993) y móviles gracias a la presencia de un flagelo polar (Actis y col 1999, Austin y Austin 1999, Holt y col 2000). Para su óptimo crecimiento en medios de cultivo, requieren que éstos estén enriquecidos con NaCl en concentraciones que pueden variar de 1% a un 3%, a una temperatura entre los 15° - 30 °C (Austin y Austin 1999^b, Actis y col 1999, Holt y col 2000). Su principal fuente de carbohidratos es la D-glucosa, utilizando también D-fructosa, maltosa y glicerol, los que al ser fermentados generan ácidos sin producción de gas. Cuando crecen en medios de cultivo con

poli- β -hidroxibutirato y escaso nitrógeno acumulan gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato (Holt y col 2000). Las bacterias de este género son sensibles al agente vibriostático 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine phosphate (O/129) y Novobiocina (Austin y Austin 1999^b, Inglis y col 1993, Roberts 2001).

Este género afecta a más de 42 especies de animales marinos (Bullock 1987), siendo las siguientes especies asociadas como patógenos de los peces (Inglis y col 1993, Reed y Francis-Floyd 1996):

- *V. anguillarum*.
- *V. ordalli*.
- *V. damsela*.
- *V. carchariae*.
- *V. vulnificus*.
- *V. alginolyticus*.
- *V. salmonicida*.

La primera especie del género *Vibrio* en ser aislada fue *V. anguillarum* en el año 1893, pero la enfermedad había sido descrita desde el año 1718 en la literatura europea (Roberts 2001, Austin y Austin 1999^a).

Schiewe y col (1981) determinaron mediante baterías bioquímicas y estudios en la secuencia de DNA que *Vibrio ordalli*, hasta entonces considerado como *Vibrio anguillarum* biotipo II, era genética y fenotípicamente diferente a *V. anguillarum*, siendo por ende una especie diferente, a la que se nombró como *Vibrio ordalii* (Austin y Austin 1999^b, Plumb 1999).

V. ordalii genera cuadros más severos de vibriosis que *V. anguillarum*, y tiene mayor afinidad por el tejido músculo esquelético, en donde se le encuentra más abundantemente formando micro colonias (Egidius 1987).

La epizootiología de ambos agentes es muy similar (Roberts 2001) y la enfermedad causada por ellos es una septicemia hemorrágica, en cuyo curso existe una correlación entre la presencia del vibrio en la sangre del huésped y la disminución del número de leucocitos, lo que sugiere la existencia de un factor leucocitolítico que tiene un importante rol en la patogénesis de la enfermedad (Ramson y col 1984, Actis y col 1999).

La prevalencia de la enfermedad es mayor en verano, cuando las condiciones medioambientales favorecen un ascenso de la temperatura de la columna de agua y una disminución del oxígeno disuelto en ella, aumentando la mortalidad de los peces enfermos junto al incremento de la temperatura del agua (Plumb 1999). El período de incubación varía con la temperatura y calidad del agua, virulencia de la cepa y grado de estrés a que estén sometidos los peces. La enfermedad se desarrolla en salmónidos cuando la temperatura ambiental bordea los 10-11 °C y puede producir mortalidades cercanas a un 50% si afecta a peces jóvenes (Roberts 2001).

La transmisión es horizontal y aunque la vía de infección es poco clara se sospecha de la transmisión por vía oral (Reed y Francis-Floyd 1996). Es posible aislar *Vibrio spp.* del tracto intestinal de peces clínicamente sanos, pero bajo ciertas condiciones la bacteria atraviesa la pared intestinal, invadiendo tejidos como hígado, bazo, músculo y branquias generando la enfermedad sistémica (Reed y Francis-Floyd 1996, Austin y Austin 1999^a).

La signología clínica comienza con letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel y muerte súbita, siendo éstos los únicos signos que pueden detectarse en salmónidos jóvenes, a los cuales se les puede sumar en ocasiones edema peri orbital y/o abdominal (Inglis y col 1993, Roberts 2001).

Las típicas lesiones externas son úlceras en la piel con zonas necróticas rojizas de la musculatura, eritema en la base de las aletas, alrededor de la boca y hemorragia en las branquias (Bullock 1987, Inglis y col 1993, Reed y Francis-Floyd 1996).

En cuadros per agudos generalmente no hay presencia de ningún signo, aunque en algunas ocasiones se describe una severa cardiomiopatía (Roberts 2001), exoftalmia (Inglis y col 1993), descamación de la piel, hepato y esplenomegalia dentro de las primeras doce horas de haber sido expuestos los peces a la bacteria (Austin y Austin 1999^a). En cuadros agudos, aparecen en la piel pequeños aumentos de volumen de color oscuro, que se ulceran liberando un exudado sanguinolento. Estas úlceras pueden ser muy profundas pudiendo necrosarse, tejido que contendrá un gran número de bacterias (Inglis y col 1993, Roberts 2001). Internamente hay licuefacción del bazo y riñón, petequias en las vísceras y peritoneo parietal, además de hemorragias en la superficie del corazón (Inglis y col 1993, Roberts 2001).

En cuadros de carácter crónico las lesiones de la piel se pueden organizar y evolucionar a granulomas, las branquias usualmente permanecen pálidas, debido a sucesivas hemorragias originadas en la cavidad abdominal, las que pueden producir adherencias entre las vísceras (Inglis y col 1993, Roberts 2001).

El diagnóstico de vibriosis se realiza con el aislamiento e identificación de la bacteria, mediante la toma de tejido renal o hepático para realizar un cultivo en agar TSA enriquecido con 1 % de NaCl e incubado a 20° - 25°C por 24 - 48 h. Las colonias obtenidas deben ser bacterias Gram negativas, citocromo-oxidasa positivas y productoras de ácido pero no de gas en medios enriquecidos con glucosa y sensibles a novobiocina y O/129 (Amos 1985).

En el diagnóstico histopatológico se evidencia necrosis muscular y de piel, necrosis y depleción de los elementos hematopoyéticos presentes en el hígado y riñón, además de una severa necrosis focal del hígado (Inglis y col 1993, Roberts 2001). Se presentan depósitos de hemosiderina entre los centros de melanomacrófagos en los casos crónicos (Roberts 2001).

La antibioterapia y la inmunización son los principales métodos de tratamiento y control para esta enfermedad (Reed y Francis-Floyd 1996). La antibioterapia es el método de control más usado, siendo oxitetraciclina, sulfonamidas y nitrofuranos, los medicamentos más utilizados; sin embargo al ser administrados por vía oral a través de los alimentos, los peces anoréxicos no reciben el tratamiento adecuado (Alvarado y col 1989, Inglis y col 1993, Roberts 2001).

La inmunización y selección genética han mostrado generar resistencia de los peces frente a las vibriosis, disminuyendo considerablemente las mortalidades (Roberts 2001). La inmunización mediante la aplicación de programas de vacunación con productos bivalentes con *V. anguillarum* y *V. ordalii*, han mostrado tener éxito disminuyendo los porcentajes de mortalidad de los peces cultivados, debido a que ambos agentes tienen inmunidad cruzada (Austin y Austin 1999^b).

El primer diagnóstico de vibriosis en Chile se realizó en Julio del 2003, a partir de brotes que afectaron a salmones del Atlántico (*S. salar*) en Quellón y el Archipiélago de las Guaitecas (Colqhoun y col 2004). Luego en trucha arco iris (*O. mykiss*) y salmón coho (*O. kisutch*), aunque por estudios retrospectivos es posible detectar reportes desde el año 1997 (Godoy 2004).

En Chile se han identificados cuadros de vibriosis originados por *V. ordalii* “atípico”, *V. vulnificus* y *V. fluvialis*, siendo la mayoría de los aislados catalogados como *Vibrio spp.* ya que su perfil bioquímico no corresponde completamente a ninguna especie conocida (Aquatic Health Chile S.A 2004).

Este *V. ordalii* “atípico” que provoca los cuadros de vibriosis en el país tiene una alta homología con las cepas de referencia internacional, dando como resultado un 99% de similitud fenotípica y genética con *V. ordalii* (Colqhoun y col 2004, Godoy 2004).

Los cuadros observados en Chile se presentan durante todo el año en las regiones X y XI, produciendo una enfermedad de carácter crónico y subagudo que ha afectado principalmente a salmón del Atlántico (*S. salar*) y a trucha arco iris (*O. mykiss*) de todas las tallas cultivadas en zonas marinas y estuarinas, registrándose mortalidades acumuladas que varían de 5 a 22% y aumentando hasta un 35% en la época estival (Godoy 2004, Aquatic Health Chile S.A 2004).

Los tratamientos que se han llevado a cabo para estos brotes se realizan con quinolonas (ácido oxolínico y flumequina) y oxitetraciclina (Aquatic Health Chile S.A 2004), pero a pesar de ello las recidivas de la enfermedad son frecuentes, debido a la presencia de infecciones mixtas o de terapias inoportunas (Godoy 2004).

Como la vibriosis es una enfermedad emergente en nuestro país, se debe contar con la mayor información posible sobre las vías de ingreso del agente y de la patogenia de la enfermedad; facilitándose la aplicación de eficientes medidas para su control tanto en peces cultivados como de la ictiofauna que comparte el mismo ecosistema.

Otros estudios realizados en Chile han reproducido exitosamente la vibriosis tras la inoculación de una cepa nacional de *V. ordalii* en salmón del Atlántico (*S. salar*) y en trucha arco iris (*O. mykiss*), que son las principales especies de salmónidos cultivadas en el país. Paredes (2005) probó cuatro vías de inoculación para reproducir vibriosis en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g; Treuquemil (2005) determinó la DL₅₀ para inoculación intraperitoneal en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g y Jiménez (2006) determinó la DL₅₀ en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g mediante la inoculación intraperitoneal de una cepa nacional de *V. ordalii*

La inducción experimental de vibriosis se ha realizado en salmón del Atlántico (*S. salar*) mediante las vías de inyección intraperitoneal, intramuscular, baño o inmersión (Paredes 2005) y en ayu (*P. altivelis*) a través de la piel y por inmersión (Kanno y col 1989).

La hipótesis de este trabajo es que la trucha arco iris (*O. mykiss*) es susceptible a una cepa nacional de *V. ordalii* aislada de salmón del Atlántico (*S. salar*), pudiendo ser inducida la vibriosis experimentalmente a través de las vías de inoculación intraperitoneal, intramuscular, por inmersión y a través de la piel.

Por lo tanto los objetivos específicos de este trabajo son:

- Reproducir la vibriosis en trucha arco iris (*O. mykiss*) mediante la inoculación de una cepa de *V. ordalii* aislada en Chile, por las vías intraperitoneal, intramuscular, por inmersión completa y a través de la piel.
- Reaislar la bacteria (*V. ordalii*) inoculada a partir de los peces moribundos afectados de vibriosis.
- Comparar los porcentajes de mortalidad y la signología clínica en trucha arco iris (*O. mykiss*) inoculadas por estas cuatro vías.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material biológico

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron 150 truchas arco iris (*O. mykiss*) de 70 a 90 g, obtenidas de una piscicultura de la Región de Los Lagos sin antecedentes de vibriosis. Fueron transportadas en recipientes plásticos con oxigenación constante, hasta la Sala de Estanques del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática de la Universidad Austral de Chile.

Para el desafío experimental se utilizó una cepa nacional de *V. ordalii* (R 157) proveniente del cepario del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática de la Universidad Austral de Chile; cepa proveniente de casos ocurridos en salmón del Atlántico (*S. salar*) a fines de Octubre del año 2003 en la Xª Región.

4.1.2 Materiales de la Sala de Acuarios

- 10 Acuarios de fibra de vidrio con tapa, con 80 l de agua.
- 10 Quechas.
- 10 Filtros de agua, con carbón activado y perlón.
- 10 Bombas de aire.
- 20 Difusores de aire.
- 10 Termómetros.
- 10 Calefactores.
- Sistema de termostato
- Material de aseo y desinfección.
- Alimento extruído comercial para peces.
- Sistema eléctrico de emergencia.
- Botas de goma, pechera plástica y delantal.
- Baldes, tambores, manguera de plástico.

- Bomba de extracción de agua.
- Densímetro.
- Probeta de 1000 ml.

4.1.3 Materiales de Laboratorio

- Material de disección y guantes de látex.
- Bandeja de disección.
- Mechero, asa de cultivo, portaobjetos.
- Placas petri con Agar Soya Trypticasa (TSA) + 2% NaCl.
- Colorantes para la tinción de Gram.
- Colorantes para la tinción de Giemsa.
- Toalla de papel.
- Alcohol 70%
- Hipoclorito de Sodio.
- Aceite de inmersión.
- Material para realizar las pruebas bioquímicas.
- Test de sensibilidad al vibriostático O/129 (Oxoid).

4.2 MÉTODO

4.2.1 Mantención de los peces

Los peces una vez ubicados en la Sala de Estanques fueron mantenidos en estanques con agua potable declorada y aireación constante y sometidos a un período de aclimatación de 10 días. Un grupo de 15 peces tomados mediante un muestreo por conveniencia fueron examinados según los protocolos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (O.I.E. 2003), para corroborar que estuvieran libres de cualquier enfermedad.

4.2.2 Preparación de la suspensión bacteriana para el desafío

La cepa de *V. ordalii* (R 157) fue descongelada y sembrada en una placa petri con agar TSA a la cual se le adicionó 2% de NaCl y cultivada por 48 hrs a 24° C. Con el fin de lograr la recuperación y reactivación de la virulencia de la cepa bacteriana se realizaron dos pasajes sucesivos en truchas arco iris (*O. mykiss*) inoculadas intraperitonealmente. Se realsó la bacteria desde los riñones de los peces moribundos y fue cultivada a 23° - 24°C por 48 horas en agar TSA al 2% NaCl.

A partir de los aislados de *V. ordalii* reactivado tras los pasajes en truchas arco iris (*O. mykiss*), se preparó una suspensión salina peptonada con una concentración bacteriana determinada por un espectofotómetro¹ a una $D.O_{600} = 1,253$ para los desafíos por vía intraperitoneal, intramuscular y a través de la piel por la adhesión de un parche cutáneo; concentración confirmada posteriormente por recuento en placa, siendo el resultado de $5,7 \times 10^8$ ucf/ml. Para la suspensión bacteriana a usar por la vía del baño se preparó una suspensión más concentrada con una $D.O_{600} = 1,305$ confirmada igualmente mediante recuento en placa en $1,47 \times 10^6$ ufc/ml.

4.3 INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS PECES

Los cuatro grupos experimentales más el grupo control, todos en duplicado, fueron inoculados simultáneamente el mismo día previa anestesia vía inmersión o baño de los peces en agua potable declorada adicionada con BZ-20^{®♦} a 40 mg/ml por 3-5 minutos con aireación constante.

Posterior a la inoculación los peces fueron ubicados en sus respectivos acuarios, contando cada uno con termómetro, calefactor, filtro purificador de agua con carbón activado y perlón, sistema de aireación constante y rótulo identificador.

4.3.1 Grupo control

Los peces fueron inoculados por vía intraperitoneal en la línea media ventral entre las aletas pectorales y pélvicas en un punto equivalente al largo de una aleta pélvica, y por vía intramuscular en la zona media entre la aleta dorsal y línea lateral, bajo el tercio anterior de la aleta dorsal en dirección cráneo-caudal con 0,1 ml de una solución salina peptonada estéril.

¹ Spectronis tipo Génesis 8.

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

4.3.2 Desafío mediante parche cutáneo

Fue embebido un parche de papel filtro estéril de 1,5 x 1,5 cm con 10 μ l de la suspensión bacteriana a una concentración de $5,7 \times 10^8$ ufc/ml. El parche fue puesto por período de un minuto sobre la piel en la zona media entre la aleta dorsal y la línea lateral, bajo el tercio anterior de la aleta dorsal. Durante el período de inoculación los peces permanecieron anestesiados fuera del agua.

4.3.3 Desafío intraperitoneal

Los peces fueron inoculados mediante una inyección vía intraperitoneal en la línea media ventral, entre la zona de las aletas pectorales y pélvicas a una distancia igual a las últimas, con 0,1 ml de la suspensión bacteriana a una concentración de $5,7 \times 10^8$ ufc/ml, lo que corresponde a $5,7 \times 10^7$ ufc/pez.

4.3.4 Desafío intramuscular

La inoculación se realizó en la zona media entre la aleta dorsal y línea lateral, bajo el tercio anterior de la aleta dorsal en dirección cráneo-caudal, y se inyectó 0,1 ml de la suspensión bacteriana a una concentración de $5,7 \times 10^8$ ufc/ml, equivalente a $5,7 \times 10^7$ ufc/pez.

4.3.5 Desafío mediante inmersión

Los peces fueron separados en tres grupos de 10 individuos y se introdujo cada grupo en un balde plástico con 9,900 l de agua a salinidad del 15 ‰ siendo adicionado a cada balde 100 ml de la suspensión bacteriana concentrada a $1,47 \times 10^7$ ufc/ml, equivalente a una concentración final de exposición de $1,47 \times 10^5$ ufc/ml, permaneciendo por una hora con aireación constante. Pasado este período fueron trasladados de forma aleatoria a los dos acuarios correspondientes.

Tabla 1: Vías de inoculación de *V. ordalii*, volumen y concentración del inóculo aplicado en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g.

Grupo	Vía de Inoculación	Número de peces inoculados	Volúmen inoculado	Concentración Bacteriana Inoculada
1	Control Intramuscular	15	0,1 ml	-
2	Control Intraperitoneal	15	0,1 ml	-
3	Parche Cutáneo	15	10 μ l	$5,7 \times 10^8$ ufc/ml
4	Parche Cutáneo	15	10 μ l	$5,7 \times 10^8$ ufc/ml
5	Intraperitoneal	15	0,1 ml	$5,7 \times 10^8$ ufc/ml
6	Intraperitoneal	15	0,1 ml	$5,7 \times 10^8$ ufc/ml
7	Intramuscular	15	0,1 ml	$5,7 \times 10^8$ ufc/ml
8	Intramuscular	15	0,1 ml	$5,7 \times 10^8$ ufc/ml
9	Inmersión	15	100 ml	$1,47 \times 10^5$ ufc/ml
10	Inmersión	15	100 ml	$1,47 \times 10^5$ ufc/ml

-: Ausencia de inóculo de bacteria

4.3.6 Mantención de los peces y acuarios post-inoculación (p.i)

Tras la inoculación, los peces se mantuvieron durante los treinta días que duró el experimento en acuarios con 80 l de agua y a una salinidad de 15 ‰ los primeros 2 días que luego fue aumentada a 17 ‰, siendo esta la concentración salina que se mantuvo hasta el final del desafío.

Los acuarios tuvieron aireación y recirculación del agua constante. Se mantuvo un fotoperíodo de 24 horas luz durante todo el trabajo, y se registro la temperatura dos veces al día.

Los cambios de agua se realizaron una vez por semana, siendo retirada de los acuarios mediante el uso de mangueras y mantenida en estanques plásticos de 100 l por doce horas para

ser mezclada con cloro con el fin de eliminar el agente presente en ella y así evitar su diseminación. La mantención y limpieza de los filtros se realizó diariamente, efectuándose la misma operación con el agua contaminada obtenida.

Los peces que fueron sometidos a necropsia y posteriormente los restos se esterilizaron dentro de bolsas plásticas en el autoclave para evitar la diseminación del agente.

4.4 CONFIRMACIÓN DE LA MORTALIDAD POR *V. ordalii*

Todos los peces encontrados muertos o moribundos fueron sometidos al protocolo de necropsia, realizándose en primaria instancia una inspección directa para el estudio clínico y anatomopatológico, para luego tomar muestras del bazo y riñón con las cuales se realizaron cultivos bacterianos. También se tomaron improntas de riñón y bazo para teñirse mediante la tinción de Gram y extendidos de sangre que fueron teñidos con la tinción de Giemsa.

4.4.1 Estudio clínico externo

Se realizó inspección directa de cada pez muestreado, realizándose una descripción macroscópica de las alteraciones externas encontradas en la cavidad oral, ojos, opérculo, branquias, aletas, ano y piel.

4.4.2 Estudio clínico interno

Luego del análisis externo de cada pez, se realizó la necropsia según los protocolos determinados por la American Fisheries Society (1992). Se desinfectó la superficie externa de los peces con Etanol 75%, para luego cortar el opérculo para observar las branquias. Luego se removieron las aletas pectorales y pélvicas del lado izquierdo del pez y se realizó una incisión a nivel de la línea media ventral entre las aletas pectorales en sentido caudal, hasta antes del poro anal; esta incisión prosiguió en sentido dorso craneal hasta llegar al extremo dorsal del septo transversal, y de ahí en sentido ventral hasta llegar al primer corte de manera tal que se remueve la musculatura del flanco para dejar expuestos todos los órganos de la cavidad abdominal, realizándose una descripción macroscópica de ellos.

4.4.3 Siembra y cultivo bacteriano

Tras realizar el estudio clínico y anatomopatológico externo e interno de cada pez, se tomo una muestra de riñón y bazo con una asa estéril, las que fueron sembradas en placas estériles con Agar Soya Tripticasa (TSA) 2% NaCl; las que fueron incubadas en una estufa de

cultivo a 22° - 23°C por siete días para observar el desarrollo de colonias bacterianas de morfología similar a la de *V. ordalii*.

A partir de estas colonias de morfología similar a *V. ordalii* se realizaron repicajes en agar TSA 2 % NaCl para obtener cultivos puros, los que fueron sometidos a tinción de Gram, motilidad, oxidasa, sensibilidad al vibriostático O/129 y otras pruebas bioquímicas.

4.4.4 Tinción Gram y Giemsa

A todos los peces se les tomó improntas de riñón y bazo que fueron fijadas con calor y teñidas con tinción Gram, las que fueron observadas con microscopio óptico con un lente de inmersión de 100 x , determinándose la presencia o ausencia en dichos tejidos de bacterias Gram negativas de morfología similar a la de *V. ordalii*.

De cada pez se tomó una muestra de sangre con una jeringa de 1 ml desde la vena caudal, sangre con la cual se realizaron frotis sobre portaobjetos limpios, los que fueron fijados inmersos en Etanol y refrigerados por 10 minutos, tras lo cual fueron secados y teñidos con la tinción de Giemsa, para determinar la presencia de bacterias de morfología similar a *V. ordalii* en la sangre.

4.4.5 Análisis de los resultados

Los resultados se muestran a continuación en tablas de distribución de frecuencias absolutas y relativas. Además de figuras con imágenes de las lesiones observadas con mayor frecuencia, gráficos de mortalidad acumulada y de temperatura de los acuarios.

5. RESULTADOS

5.1 MORTALIDADES

5.1.1 Mortalidad del desafío vía Parche Cutáneo (PC)

En esta vía de inoculación solamente se detectó un pez moribundo durante todo el período de estudio, perteneciente al grupo 3, siendo la mortalidad acumulada específica al final del desafío de un 6,67 % para el grupo y de un 3,33 % para la vía utilizada (Ver Tabla 2). Sobreviviendo en total 29 peces.

Todos los peces sobrevivientes fueron sacrificados al final del estudio no reaislándose bacterias desde el riñón y siendo negativo el análisis de las improntas de órganos y el extendido de sangre, a la tinción Gram y Giemsa respectivamente.

5.1.2 Mortalidad del desafío vía Intra Peritoneal (IP)

No se presentaron mortalidades sino hasta el día 25 del desafío, en el que un pez del grupo 5 se encontró moribundo con signología clínica de vibriosis, reaislándose *V. ordalii* a partir de muestras de riñón y bazo. No se detectó el agente inoculado en las improntas de dichos órganos como tampoco en los extendidos de sangre.

Sobrevivieron 14 peces en el grupo 5 y 15 en el grupo 6; obteniéndose al final del desafío un 3,33% de mortalidad acumulada específica para esta vía de inoculación (Ver Tabla 2).

Todos los peces sobrevivientes fueron sacrificados al final del estudio no reaislándose bacterias desde el riñón y siendo negativo el análisis de las improntas de órganos y el extendido de sangre, a la tinción Gram y Giemsa respectivamente.

5.1.3 Mortalidad del desafío vía Intra Muscular (IM)

La mortalidad en los grupos 7 y 8 se observó a partir del 2º día post inoculación (p.i) alcanzando su punto mas alto el día 24 p.i, con 5 peces (33,33%) para el grupo 7 y de 2 peces para el grupo 8 (13,33 %). Siendo la mortalidad acumulada específica para la vía IM de 23,33% (Ver Tabla 2).

Sobrevivieron al desafío 10 peces del grupo 7 y 13 del grupo 8, los que fueron sacrificados al final del período de estudio, no reaislándose bacterias desde el riñón y siendo negativo el análisis de las improntas de órganos y el extendido de sangre, a la tinción Gram y Giemsa respectivamente.

5.1.4 Mortalidad del desafío vía Inmersión (I)

A partir del 2º día p.i se observo mortalidad específica en ambos grupos (9 y 10), alcanzando ésta su mayor punto el día 26 del desafío. La mortalidad acumulada específica para el grupo 9 fue de 11 peces (73,33 %) y para el grupo 10 de 2 peces (13,33 %). Siendo la mortalidad acumulada específica para esta vía de inoculación (grupo 9 y 10) de 43,33 % (Ver Tabla 2).

Para el grupo 9 no se observaron mortalidades a partir del día 27 p.i y del día 4 p.i para el grupo 10. Sobreviviendo 4 peces en el grupo 9 y 13 en el grupo 10.

Todos los peces sobrevivientes fueron sacrificados al final del estudio no reaislándose bacterias desde el riñón y siendo negativo el análisis de las improntas de órganos y el extendido de sangre, a la tinción Gram y Giemsa respectivamente.

5.1.5 Mortalidad del Grupo Control (C)

En el quinto día p.i se encontró un pez moribundo en el grupo nº 2, sin presentar signología clínica de la enfermedad. Fue sacrificado y no se encontró ningún hallazgo de enfermedad, catalogándose como muerte inespecífica.

Mortalidad acumulada específica por Vibriosis

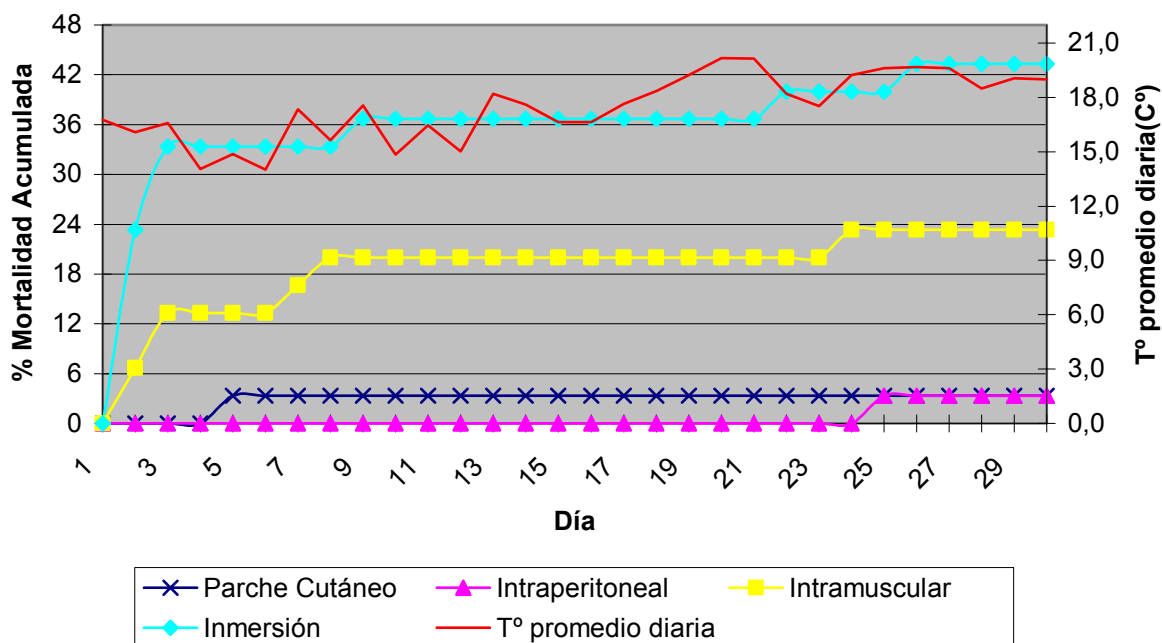


Gráfico 1: Evolución de la mortalidad acumulada específica por vibriosis en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g, inoculados vía parche cutáneo, intraperitoneal, intramuscular e inmersión con una cepa de *V. ordalii*, a una salinidad de 17 ‰ y variación diaria de la temperatura del agua.

Tabla 2: Porcentaje de mortalidad acumulada por vibriosis en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g inoculados vía parche cutáneo, intraperitoneal, intramuscular e inmersión con una cepa de *V. ordalii* a una salinidad de 17 ‰ mantenidos por 30 días a una temperatura promedio de 17,5° C.

	Control		Parche Cutáneo		Intraperitoneal		Intramuscular		Inmersión	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10
Mortalidad acumulada por Grupo (%)	-	-	6,67	-	6,67	-	33,33	13,33	73,33	13,33
Mortalidad acumulada por Vía de Inoculación(%)	-		3,33		3,33		23,33		43,33	

- : Ausencia de mortalidad

5.2 CONFIRMACION DE LAS MORTALIDADES POR *V. ordalii*

5.2.1 Signología clínica

Mediante el examen clínico externo e interno realizado al total de los peces muertos y/o moribundos que cursaron con vibriosis (22 individuos), se establecieron los signos clínicos más comunes y fueron tabulados en la Tabla 3.

Tabla 3: Signos clínicos presentes en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g inoculados con *V. ordalii* a través de las vías parche cutáneo (P.C), intraperitoneal (I.P), intramuscular (I.M) e inmersión (I).

Signología	Vía de Inoculación (Nº de peces)				Número y porcentaje de individuos con signología de Vibriosis	
	P.C (1)	I.P (1)	I.M (7)	I (13)		
Oscurecimiento de la piel	1	1	4	5	11	50,00%
Descamación de la piel	1	1	5	11	18	81,82%
Úlcera piel c/sin compromiso muscular	1	1	4	8	14	63,64%
Exoftalmia uni/bilateral	1	1	7	11	20	90,91%
Hemorragia ocular uni/bilateral	1	-	2	5	8	36,36%
Cavidad oral hemorrágica	-	-	1	2	3	13,64%
Hemorragia poro anal	-	-	2	3	5	22,73%
Aletas hemorrágicas	1	1	5	10	17	77,27%
Edema zona inoculación	-	-	5	-	5	22,73%
Hemorragia zona inoculación	-	-	4	-	4	18,18%
Enteritis	1	1	6	10	18	81,82%
Pared abdominal hemorrágica	1	-	6	5	12	54,55%
Musculatura hemorrágica	1	1	5	4	11	50,00%
Esplenomegalia y bazo friable	1	1	7	13	22	100,00%
Riñón edematoso	1	1	5	6	13	59,09%

- : ausencia de signología.

El signo clínico presentado con mayor frecuencia fue la esplenomegalia y bazo friable, presente en el 100 % de los peces, la que fue seguida por exoftalmia uni/bilateral con un 90,91 %, enteritis y descamación de la piel presentes en el 81,82 % de los peces encontrados muertos y/o moribundos desafiados con *V. ordalii* (Ver Figuras 1, 2 y 3).

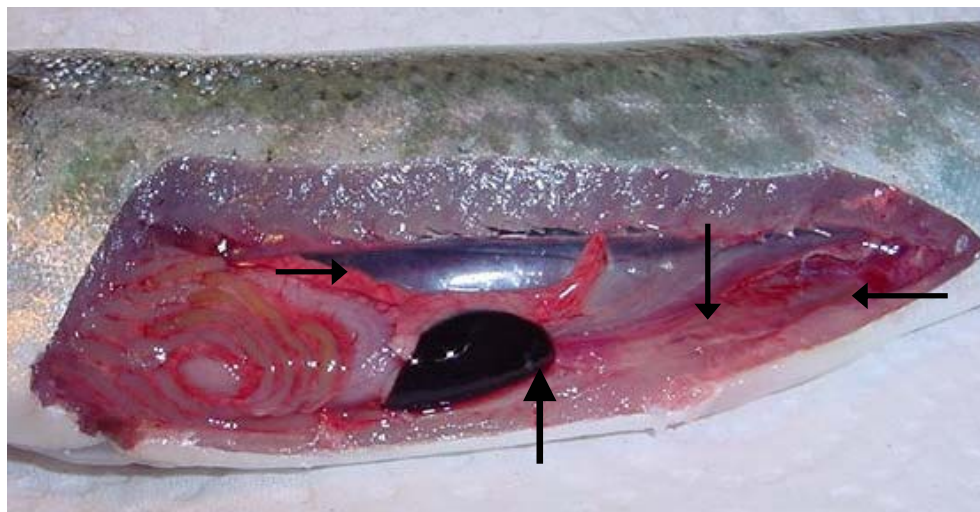


Figura 1: Trucha arco iris (*O. mykiss*) 70 a 90 g inoculado con *V. ordalii* con esplenomegalia (↑), cavidad abdominal hemorrágica (↓), grasa abdominal hemorrágica (→) y enteritis hemorrágica (←).



Figura 2: Trucha arco iris (*O. mykiss*) 70 a 90 g inoculado con *V. ordalii* con aleta dorsal congestiva.



Figura 3: Trucha arco iris (*O. mykiss*) 70 a 90 g inoculado con *V. ordalii* con exoftalmia bilateral y hemorragia ocular unilateral.

5.2.2 Cultivo bacteriológico

De todos los peces muertos y/o moribundos (22 peces) se pudo reaislar *V. ordalii* desde muestras tomadas del riñón y bazo. Dichas muestras fueron cultivadas en agar TSA 2% NaCl e incubadas durante siete días a 22° - 23 °C, observándose crecimiento bacteriano a las 48 h de colonias pequeñas de 1-2 mm de diámetro, circulares, solevantadas, blanquecinas y filantes, de características similares a las de *V. ordalii*.

Todas las colonias obtenidas de riñón con morfología similar a *V. ordalii* fueron repicadas para obtener cultivos puros y a partir de estos se realizó tinción de Gram para determinar sus características morfológicas, obteniéndose en todos los casos bacilos curvados Gram negativos. Además, se realizó con ellas el test de motilidad, que resulto positivo para todos los aislados.

5.2.3 Tinción Gram

Todas las improntas de riñón y bazo realizadas a los peces muestreados fueron teñidas con la tinción de Gram para determinar la presencia de bacilos Gram negativos en ellos. La que fue positiva en el 86,36 %de las muestras de bazo y en el 81,82 % de las muestras de riñón.

Dentro de las muestras positivas, la vía de inoculación por inmersión fue la que tuvo mayor frecuencia de observación de bacilos Gram negativos en riñón con un 55,56 %, siendo seguida por la vía Intra Muscular con un 38,89 %. En el caso de las improntas de bazo, la vía que tuvo mayor frecuencia de observación de bacilos Gram negativos fue la vía de baño (63,16 %), siendo seguida por la vía I.M con un 31,58 % (Ver Tabla 4).

Tabla 4: Frecuencia de observación de bacilos Gram negativos en improntas de riñón y bazo de trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g inoculados con *V. ordalii* por las vías de Parche Cutáneo (P.C), Intra Peritoneal (I.P), Intra Muscular (I.M) e Inmersión (I), en relación al total de muestras positivas para cada órgano.

Vía de inoculación	Muestras de Riñón con Bacilos Gram (-)		Muestras de Bazo con Bacilos Gram (-)	
	nº	%	nº	%
P.C	1	5,56	1	5,26
I.P	-	-	-	-
I.M	7	38,89	6	31,58
Inmersión	10	55,56	12	63,16
Total muestras positivas	18	100%	19	100%

- :ausencia de muestras positivas

5.2.4 Tinción Giemsa

La tinción Giemsa de los frotis de sangre reveló la presencia de bacterias de morfología similar a *V. ordalii* en el 40,91 % de las truchas arco iris inoculadas y encontradas muertas y/o moribundas.

Estas muestras positivas corresponden a peces muertos y/o moribundos que fueron encontrados entre los días 2 y 7 p.i y corresponden a peces inoculados por las vías intramuscular e inmersión.

6. DISCUSIÓN

La inducción de vibriosis en trucha arco iris (*O. mykiss*) a través de la inoculación experimental de una cepa atípica de *V. ordalii* por las vías de inoculación intraperitoneal (I.P), intramuscular (I.M), inmersión (I) y por la piel aplicando un parche cutáneo (P.C), constituye un aporte, ya que entrega información sobre la forma de entrada de la bacteria y patogenia de la enfermedad en éstos salmónidos. Datos que ayudaran a complementar los estudios de Treuquemil (2005) quien determinó la DL₅₀ en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g, Paredes (2005) sobre la inoculación experimental de *V. ordalii* por cuatro vías diferentes en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g, y Jiménez (2006) quien determinó la DL₅₀ en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g. Estudios que en su conjunto aportan información sobre una enfermedad que afecta a las dos especies de salmónidos que se cultivan en mayor cantidad en Chile.

Las vías de inoculación elegidas para este estudio ya habían sido probadas con éxito en la reproducción de otras enfermedades causadas por bacterias Gram negativas como *P. salmonis* en trucha arco iris (*O. mykiss*)(Ojeda 2000, Pizarro 1998), *A. salmonicida* en salmón del Atlántico (*S. salar*)(González 2002, Quinteros 2004), de *V. anguillarum* en ayu (*P. altivelis*) por Kanno y col (1989) y *V. ordalii* en salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha arco iris (*O. mykiss*) por Paredes (2005) y Jiménez (2006), respectivamente.

La vibriosis pudo ser reproducida por las cuatro vías de inoculación, causando la vía inmersión o baño el mayor porcentaje de mortalidad acumulada (43,33%) tras haberse inoculado $1,47 \times 10^5$ ufc/ml. La mortalidad se inició el día 2 post inoculación (p.i) con características y signología clínica de cuadro per agudo según lo reportado por Austin y Austin (1999) finalizando del día 26 p.i. con peces que presentaron un cuadro subagudo.

Este resultado es inferior al obtenido por Spanggaard y col (2000) en trucha arco iris (*O. mykiss*) con *V. anguillarum* quienes aplicando una dosis de 10^7 ufc/ml obtuvieron una mortalidad acumulada del 100% a las 96 h post inmersión. Otro desafío vía inmersión en salmón del Atlántico (*S. salar*) con *V. anguillarum* logró un 80 a 100% de mortalidad en salmones desafiados con una dosis de 1 a $2,5 \times 10^5$ ufc/ml (Austin y Austin 1999) y superior a la obtenida por Paredes (2005) quien tras inocular con la misma cepa de *V. ordalii* en salmón del Atlántico (*S. salar*) en una dosis de 8×10^6 ufc/ml logró un 20% de mortalidad acumulada. Las diferencias en los porcentajes de mortalidad obtenidos se pueden explicar ya que estos estudios fueron realizados en otras especies de peces o con otra especie de *Vibrio*.

En cuanto a las posibles rutas de ingreso de *V. anguillarum* por medio de desafíos vía inmersión, Nelson y col (1985) y Robohm y Koch (1995) concuerdan en que la ingestión es una de las principales rutas de ingreso de la bacteria en los peces desafiados. En relación a las branquias Baudin Laurencin y Germon (1987) sugieren que éstas son un sitio de entrada para *V. anguillarum* en trucha arco iris (*O. mykiss*). Kanno y col (1989) lograron un 3% de mortalidad tras la aplicación directa de la bacteria sobre las branquias de ayu (*P. altivelis*). De la misma forma Spanggaard y col (2000) sugieren que es probablemente uno de los principales puntos de entrada de *V. anguillarum* en trucha arco iris (*O. mykiss*). Situación que dependerá de la temperatura y salinidad del agua en que se encuentren los peces inoculados según lo determinaron Bordas y col (2003).

Con respecto al ingreso de *V. anguillarum* por la piel, podemos decir que hay escasas publicaciones sobre la invasión bacteriana sobre la piel intacta, siendo Kanno y col (1989) los primeros en describir una infección experimental de Vibriosis en ayu (*P. altivelis*) tras la aplicación de un papel embebido con una suspensión bacteriana de *V. anguillarum* en la piel intacta de los peces. Es por ello pertinente profundizar más sobre éste tema al momento de analizar los resultados obtenidos por la vía P.C.

El tiempo de inmersión de una hora que se utilizó en este trabajo fue mayor que el utilizado por Kanno y col (1989) quien utilizó 5 minutos, pero coincide con el utilizado por Austin y Austin (1999) con *V. anguillarum*, *A. salmonicida* (Quinteros 2004), *P. salmonis* (Ojeda 2000) y por Paredes (2005) con *V. ordalii*. Durante la inmersión los peces se mantuvieron con aireación constante y la temperatura de la suspensión bacteriana fue de 19° C y la salinidad de 15⁰/₀₀ factores que condicionan una mayor adherencia de *V. anguillarum* hacia las branquias de los peces (Bordas y col 2003), obteniéndose como resultado de ello en éste estudio una mayor mortalidad que la obtenida por Paredes (2005) quien inoculó con la misma cepa de *V. ordalii* en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g, a una temperatura de 13,7° C y una salinidad de 10⁰/₀₀.

Los esquemas de inmersión o baño han sido utilizados ampliamente como método de desafío en peces, debido a que a pesar de ser artificial es el que mejor simula la situación natural (Amend 1981). Debido a que al permanecer los peces en el agua se disminuye el estrés por manipulación y es expuesta la totalidad de la superficie corporal del pez en forma simultánea a la bacteria (Pizarro 1998, Ojeda 2000, Paredes 2005). Es así que esta vía ya ha permitido la reproducción artificial de otras enfermedades como furunculosis, yersiniosis y piscirickettsiosis.

Las diferencias en las mortalidades existentes entre los dos grupos sometidos a desafío por inmersión puede ser atribuida a un efecto estanque o “penn-effect” debido a la existencia de diferencias medioambientales existentes entre los acuarios, aunque éstos hayan sido aparentemente similares. Otro punto a considerar es que la exposición de los peces a la

suspensión bacteriana durante el desafío probablemente no fue uniforme debido de igual forma a un efecto estanque.

La segunda vía que tuvo éxito para reproducir la enfermedad fue la vía intramuscular (I.M), que alcanzó una mortalidad acumulada específica por vibriosis de 23,33 % tras haber inoculado una dosis bacteriana de $5,7 \times 10^7$ ufc/0,1 ml. La mortalidad se inició el día 2 p.i finalizando el día 24 p.i. Paredes (2005) obtuvo una mortalidad acumulada específica por vibriosis del 100% tras inocular por la misma vía, el mismo volumen del inóculo con una concentración bacteriana de $5,7 \times 10^6$ ufc/0,1 ml a salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15–20 g .

El volumen del inóculo utilizado por esta vía (I.M) es el mismo utilizado con otras bacterias de la familia **Vibrionaceae** en estudios anteriores (Austin y Austin 1999, González 2002, Quinteros 2004, Paredes 2005).

La diferencia en la mortalidad acumulada que se presentó en esta vía de inoculación se puede deber a que los peces utilizados en este estudio eran de un mayor peso (70-90 g) al utilizado en la mayoría de los estudios de inducción experimental de enfermedades. Lo que concuerda con lo mencionado por Amend (1981) quien hace mención en su trabajo que peces más grandes son generalmente más resistentes a las enfermedades.

Para la vía de inoculación intraperitoneal (I.P) la mortalidad acumulada específica fue de 3,33 % cifra inferior a la obtenida por Paredes (2005) en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g.

La baja mortalidad obtenida por esta vía se puede atribuir a que la concentración bacteriana del inóculo fue inferior a la DL_{50} para trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 gramos inoculados vía I.P con la misma cepa bacteriana a una temperatura promedio de 17°C y un 17‰ de salinidad determinada por Jiménez (2006) en 10^8 ufc/0,1 ml. Siendo la dosis usada por esta vía en el presente trabajo de 10^7 ufc/0,1ml, dosis cercana a la utilizada por Paredes (2005) en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g reafirmando lo mencionado por Amend (1981) con respecto al aumento en la resistencia a enfermedades en peces de mayor tamaño.

En cuanto a inoculación a través de la piel mediante la aplicación de un parche cutáneo (P.C), cabe señalar que la piel de los peces es una excelente barrera física y química para evitar la penetración de microorganismos (Evelyn 1996).

El esquema utilizado para la vía P.C (aplicación de un papel filtro embebido con una suspensión bacteriana sobre la piel intacta de los peces) fue similar al utilizado por Kanno y

col (1989) y por Ojeda (2000) quienes reprodujeron vibriosis en ayu (*P. altivelis*) de 3-48 gramos y piscirickettsiosis en trucha arco iris (*O. mykiss*) 15 g respectivamente.

La mortalidad acumulada específica para esta vía fue de 3,33%, cifra más baja que la obtenida por Kanno y col (1989) quienes obtuvieron una mortalidad acumulada del 60%. Ésta diferencia en la mortalidad acumulada se puede explicar debido a que el estudio de Kanno y col (1989) se realizó en otra especie de pez inoculando *V. anguillarum* en una dosis de 10^8 ufc/0,1 ml, dosis más elevada que la usada en éste estudio que fue de $5,7 \times 10^7$ ufc/0,1 ml.

Las diferencias mortalidades existentes dentro de los grupos sometidas a las mismas vías de inoculación se pueden ser explicadas por el llamado “penn-effect” o efecto estanque, ya que aunque al parecer se mantuvieron las mismas condiciones medioambientales para todos los grupos, existen pequeñas diferencias que pueden influir significativamente en la forma en que una enfermedad afecta a los peces.

Las mortalidades que se presentaron durante este estudio correspondieron a cuadros que variaron desde per agudos (2 días p.i), pasando por agudos y sub agudos que presentaron mortalidades hasta el día 26 p.i no mostraron mayores diferencias en su signología clínica, a excepción de la presentación de lesiones ulcerativas con o sin compromiso muscular, las que fueron mucho más extensas y evidentes en los cuadros agudos y sub agudos, evidenciándose de esta forma la afinidad de *V. ordalii* por el tejido músculo esquelético (Egidius 1987). Se pudo detectar la presencia de *V. ordalii* en las improntas de riñón y bazo obtenidas de los peces muertos y/o moribundos desde el día 2 p.i en adelante y fue observada en los frotis de sangre de los peces muertos y/o moribundos entre los días 2 y 7 p.i, evidenciándose una bacteremia temprana.

Mediante la tinción Gram realizada a las improntas de riñón y bazo tomadas de todos los peces muertos y/o moribundos, se determinó que en todas las vías de inoculación utilizadas en este trabajo hubo una fase de bacteremia, ya que se encontraron bacilos pleomórficos Gram negativos en el 81,82 % y 86,36% de las improntas de riñón y bazo, respectivamente. Lo que fue confirmado por la observación de los frotis de sangre obtenidos de los peces muertos y/o moribundos teñidos con la tinción de Giemsa, mostraron que en un 40,91% de los peces muestreados fueron detectados bacilos de morfología similar a *V. ordalii*.

A diferencia de los estudios realizados por Paredes (2005) y Treuquemil (2005) el grupo control fue inoculado con una solución salina peptonada (SSP) ya que ésta produce menos irritación² en los peces que la solución salina estéril al 1,5% NaCl utilizada en dichos estudios. Cabe señalar que en el presente estudio solo un pez del grupo control murió y obtenidos los

² Comunicación personal Sra Mónica Monrás, Tecnólogo Médico Laboratorio de Ictiopatología UACH.

resultados de los análisis pertinentes se concluyó que la muerte había sido provocada por causa inespecífica.

La cepa de *V. ordalii* utilizada en éste estudio era mantenida congelada en el cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile, debió ser descongelada e inoculada previamente en trucha arco iris (*O. mykiss*) en dos pasajes para recuperar su patogenicidad. Este método de reactivación se realiza ya que Brock y col (1998) describieron que la virulencia de los agentes patógenos puede verse mermada o simplemente desaparecer si es que se mantienen por largos períodos en el laboratorio sin realizar pasajes en animales susceptibles.

En general las mortalidades que se presentaron en éste trabajo son más bajas que las obtenidas por otros autores con la aplicación de esquemas similares a los utilizados en el presente trabajo. Esto debido probablemente a la mayor resistencia de los peces utilizados en este estudio ya que eran de mayor tamaño (70-90 g), o a la menor virulencia de la cepa provocada por estar frente a una especie diferente de salmónido de la que fue aislada o por haberse realizado sólo 2 pasajes de la bacteria en peces sanos, para obtener su completa reactivación y patogenicidad.

Con respecto a la signología clínica desarrollada en los peces desafiados con las cuatro vías de inoculación podemos mencionar que todos los cuadros de vibriosis inducidos en el presente trabajo cursaron con signología clínica similar, siendo los signos más frecuentes: esplenomegalia y bazo friable, exoftalmia uni/bilateral, enteritis, descamación de la piel, aletas congestivas/hemorrágicas y úlceras en la piel. Éstos concuerdan con los signos clínicos descritos por Godoy (2004) de cuadros naturales y Paredes (2005) en la inducción experimental de vibriosis en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g.

El reaislamiento bacteriano se realizó a partir de muestras tomadas del riñón de los peces muertos y/o moribundos de manera individual, obteniéndose colonias bacterianas puras de *V. ordalii* atípico, a las que se les realizaron las baterías bioquímicas y esquema diagnóstico recomendado por la American Fisheries Society (1992). Se demostró que la bacteria reaislada en todos los peces muertos y/o moribundos era efectivamente la bacteria inoculada al comienzo de éste estudio, cumpliéndose de tal forma los postulados de Koch.

CONCLUSIONES

La vibriosis puede ser reproducida en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 gramos mediante la inoculación experimental de *V. ordalii* atípico aislada en salmón del Atlántico

(*S. salar*) a través de las vías intraperitoneal, intramuscular, inmersión y por la piel. Por lo que se acepta la hipótesis planteada en este trabajo.

Dentro de las vías de inoculación probadas en éste estudio, de acuerdo a las mortalidades obtenidas, la exposición completa del pez mediante la inoculación por inmersión resultó ser la puerta de entrada más efectiva para inducir la vibriosis en trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 gramos.

Fue posible reaislar la bacteria inoculada de todos los peces muertos y/o moribundos afectados por vibriosis, cumpliéndose los postulados de Koch.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Actis LA, ME Tolmasky, JH Crosa. 1999. Vibriosis. En: PTK Woo and DW Bruno (eds). *Fish disease and disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal infections*. Pp 523-557. CABI Publishing, Oxon.
- Alvarado V, W Schafer, R Enriquez, M Monras. 1989. Vibrio. En: *Curso de post grado "Enfermedades bacterianas en peces y sus técnicas diagnósticas"*. Pp. 33-39. Universidad Austral de Chile, Facultad de3 Ciencias Veterinarias, Valdivia.
- Amend DF. 1981. Potency Testing of Fish Vaccines. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. En Anderson DP, Hennessen (ed). *Developments in Biological Standardization*. Pp 447-454. S. Krager, Switzerland.
- 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.
- Amos K. 1985. Vibriosis. En: *Procedures for the detection and identification of certain fish pathogen*. 3° edition. Pp 47. American fisheries society, fish health section, Maryland.
- Aquatic Health Chile S.A. 2004. En: *Enfermedades presentes en Salmonicultura chilena y que requieren el uso de vacunas para su prevención*. Pp. 29-32. Documento elaborado por profesionales de Aquatic Health S.A para SalmonChile Intesal.
- Austin B, AD Austin. 1999^a. Charecteristics of the diseases. En: *Bacterial fish pathogens; Disease of farmed and wild fish*. 3° edition. Pp. 28-31. Proxis Publishing, Cornwall.
- Austin B, AD Austin. 1999^b. Epizootiology: Gram-negative bacteria. En: *Bacterial fish pathogens; Disease of farmed and wild fish*. 3° edition. Pp. 238-241. Proxis Publishing, Cornwall.

- Baudin Laurencin F, E Germon. 1987. Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping suspensions of *Vibrio anguillarum*: ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity. *Aquaculture* 67,203-205.
- Bordas MA, MC Balebona, M Chabrillón, JM Rodríguez-Maroto, MA Moriñigo. 2003. Influence of temperature and salinity on the adhesion to mucous surfaces of glit-head seabream (*Sparus aurata* L.) of pathogenic strains of *Vibrio alginolyticus* and *Listonella anguillarum*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* 23(6),273-280.
- Brock TO, MT Madigan, JM Martinko, J Parker. 1998. *Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Prentice Hall, Madrid.
- Bullock GL. 1987. *Vibriosis in fish*. <http://www.lsc.usgs.gov/FHB/leaflets/77.asp> visitada el 28/12/2004.
- Colquhoun DJ, IL Aase, C Wallace, Á Baklien, K Gravningen. 2004. First description of *Vibrio ordalii* from Chile. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*. 24,185-188.
- Egidius E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A review. *Aquaculture* 67, 18-28.
- Eng CHT, E Tech. 2002. Introduction and history of cage culture. En: P.T.K Woo and D.W. Bruno (eds). *Diseases and disorders of finfish in cage culture*. Pp 1-39. CABI Publishing, Oxon.
- Evelyn TP. 1996. Infection and disease. En : Iwama G, Nakanishi T (eds). *The fish immune system*. Pp. 339-366. Academic Press, New York.
- Godoy M. 2004. Salmónidos afectados por Vibriosis en Chile. *Aquanoticias internacional* 91, 88-90.
- González ED. 2002. Descripción de la Furunculosis producida por *Aeromona Salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie *salmonicida* en salmón del atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

- Holt J, N Krieg, P Sneath, J Staley, S Williams. 2000. Group 5: facultatively anaerobic gram-negative rods. En: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Pp. 190-194. Ninth Edition. Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Inglis V, R Roberts, NR Bromage. 1993. Chapter 6: Vibriosis. En: *Bacterial diseases of fish*. Pp.109-119. Institute of aquaculture, New York.
- Jiménez LF. 2006. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de una cepa nacional de *Vibrio ordalii* en trucha arco iris (*O. mykiss*). *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Kanno T, T Nakai, K Muroga. 1989. Mode of transmisión of Vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1, 2-6.
- Kinkelin P. 1985. Aspectos epidemiológicos de las bacteriosis. En: *Tratado de las enfermedades de los peces*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.
- Nelson JS, JS Rohovec, JL Fryer. 1985. Location of *Vibrio anguillarum* in tissues of infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using the fluorescent antibody technique. *Fish Pathol.* 20, 229-235.
- Organización Mundial de Sanidad Animal(O.I.E.). 2003. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*.4th edition. Office International des Epizooties, Paris.
- Ojeda PA. 2000. Estudio de piel y branquias como vías de ingreso de *Piscirickettsia salmonis* y evaluación de métodos de desafío experimental para piscirickettsiosis en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile
- Paredes MS. 2005. Inoculación experimental a través de cuatro vías de *Vibrio ordalii* aislado en Chile en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Pizarro PC. 1998. Estudio de la vía gastrointestinal como ruta de ingreso de *Piscirickettsia* salmones y evaluación de métodos de reproducción experimental de piscirickettsiosis en

truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Plumb JA. 1999. Salmonid bacterial disease. En: *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. Pp. 235-239. Iowa Estate University, Iowa.

Post G. 1983. Pathogenic Vibrio: Vibriosis of fishes. En: *Textbook of fish health*. Pp. 38-41. T.F.H Publications, Inc Ltd., The British Crow Colony of Hong Kong.

Quinteros VL. 2004. Inducción experimental de la Furunculosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con *Aeromona salmonicida* subs. *Achromogenes* a través de diferentes vías de inoculación. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

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

Reed P, R Francis-Floyd. 1996. *Vibrio infections of fish*. En: IFAS extensión. University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FA/FA03600.pdf> visitada el 28/12/2004.

Roberts RJ. 2001. Vibrionaceae. En: *Fish Pathology- The Bacteriology of Teleosts*. Pp. 191-194. 3° Edition. Bailliere Tindall by Cassel Ltd., London.

Robohm RJ, RA Koch. 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* salmones y evaluación de métodos de reproducción experimental de Piscirickettsiosis en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

SalmónChile. 2003. *La Acuicultura en Chile*. Techno Press S.A., Santiago.

Schiewe M, JT Trevor, JH Crosa. 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of Vibriosis in Fish. *Current Microbiology* 6, 343-348.

Sapangaard B, I Huber, J Nielsen, T Nielsen, L Gram. 2000. Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases* 23, 423-427.

Stephen C, G Iwama. 1997. *Fish Health. Salmon Aquaculture Review*. Volume 3. Environment Assessment Office, Government of British Columbia.

Treuquemil CS. 2005. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) de una cepa nacional de *Vibrio ordalii* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Anexo 2: Registro diario de temperatura del agua de los acuarios de trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g inoculados vía parche cutáneo (PC), intraperitoneal (IP), intramuscular (IM) e inmersión (I) con una cepa de *V. ordalii* mantenidos por 30 días a una salinidad de 17 ‰.

Día post inoculación	Vía de Inoculación					Promedio diario temperatura
	Control	PC	IP	IM	I	
1	13,5	14,1	18,0	19,5	18,6	16,8
2	13,0	16,0	17,3	17,9	16,3	16,1
3	13,4	14,0	17,8	19,5	18,3	16,6
4	13,5	14,6	14,6	14,9	12,6	14,1
5	14,8	15,0	15,6	15,1	13,9	14,9
6	14,4	14,6	14,5	13,9	12,8	14,0
7	16,8	16,3	17,9	18,6	17,3	17,4
8	14,1	13,9	16,8	17,3	16,1	15,6
9	16,8	16,5	18,0	18,9	17,6	17,6
10	14,0	13,8	15,8	16,0	14,8	14,9
11	14,0	14,3	17,4	19,1	17,6	16,5
12	14,8	14,5	15,8	15,6	14,5	15,0
13	15,8	16,8	19,5	20,3	18,8	18,2
14	16,3	13,8	19,8	19,0	19,3	17,6
15	15,3	14,0	18,3	17,8	18,0	16,7
16	14,5	16,8	17,5	17,3	17,3	16,7
17	17,3	15,5	18,5	19,3	17,8	17,7
18	17,3	17,3	19,0	19,5	18,8	18,4
19	17,5	18,6	20,5	20,8	18,8	19,2
20	19,3	19,8	21,3	21,8	18,9	20,2
21	19,5	19,8	21,5	20,3	19,8	20,2
22	15,8	16,8	19,5	20,3	18,8	18,2
23	16,9	15,5	18,5	18,8	18,0	17,5
24	18,0	17,3	19,3	21,3	20,4	19,2
25	18,3	17,1	21,0	21,8	20,0	19,6
26	18,3	17,3	20,8	21,5	20,6	19,7
27	17,6	19,4	21,5	20,5	19,0	19,6
28	17,0	16,5	20,0	20,0	19,0	18,5
29	17,5	17,5	20,3	20,8	19,3	19,1
30	17,6	17,4	19,9	20,6	19,5	19,0
Temperatura promedio durante el estudio						17,5

Anexo 3: Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias de *V. ordalii* aisladas de cultivos de riñón de truchas arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g inoculados por las vías parche cutáneo, intraperitoneal, intramuscular e inmersión.

Prueba bioquímica	<i>V. ordalii</i> atípico aislado en Chile (*)	Vía parche cutáneo	Vía intraperitoneal	Vía intramuscular	Vía Inmersión
Motilidad	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Fermentación Glucosa	+	+	+	+	+
Gas Glucosa	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-
Rojo Metilo	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	-
Lisina decarboxilasa	-	-	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	-	-	-
Reducción Nitrato	+	+	+	+	+
Citrato Simmons	-	-	-	-	-
Hidrólisis Gelatina	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-
Sensibilidad a O/129	+	+	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-	-

(*): Colqhoun y col 2004

(+): Positivo

(-): Negativo

9. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Enríquez, Sra. Mónica Monrás, Dra. Vania Quinteros y Sr. Esteban Henríquez por todo su apoyo, ayuda y confianza entregados durante el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos, mi gran familia urbana, generosa en sentimiento y sabiduría. Gracias a todos por vuestro apoyo, amor y consejo oportuno.

A mis padres, hermano y Tito. Por todo el sacrificio, apoyo, paciencia y ánimo vertidos. Todo esto es gracias a ustedes.