

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

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) DE UNA CEPA NACIONAL DE
VIBRIO ORDALII EN TRUCHA ARCO IRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

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

LUIS FELIPE JIMÉNEZ AGUILERA

VALDIVIA – CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enríquez S.
Nombre

Firma

COLABORADOR

Sra. Mónica Monrás.
Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Rafael Burgos A.
Nombre

Firma

Dr. Jorge Toro Y.
Nombre

Firma

FECHA DE APROBACION:

15 de mayo 2006

A mis Padres

ÍNDICE

Capítulo	Página
1.- RESUMEN.....	1
2.- SUMMARY.....	2
3.- INTRODUCCIÓN.....	3
4.- MATERIAL Y MÉTODO.....	8
5.- RESULTADOS.....	15
6.- DISCUSIÓN.....	20
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	25
8.- ANEXOS.....	29
9.- AGRADECIMIENTOS.....	32

1. RESUMEN

Con el objetivo de determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) de una cepa nacional de *Vibrio ordalii* en Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se obtuvieron alevines de 70-90 gramos de una piscicultura libre de Vibriosis. Los peces fueron trasladados y aclimatados durante una semana en estanques de 800 litros, con aireación y flujo de agua constante, alimentación comercial en base al 2% de su peso vivo. Durante este tiempo fueron chequeados sanitariamente de acuerdo al protocolo del Manual de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos (OIE 2003).

Previo al inicio del estudio, la cepa a usar denominada R 157 proveniente de un brote en el sur de Chile en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y mantenida en el cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile fue descongelada e inoculada en 6 peces de 70-90 gramos para recuperar su patogenicidad. Este proceso se repitió dos veces. De los peces muertos o moribundos se reaisló la bacteria desde el riñón y se cultivó en Agar Trypticase de Soya (TSA) al 2% NaCl. Para la manipulación, los peces fueron anestesiados con Etil para-aminobenzoato (BZ-20[®]) vía baño.

Para la determinación de la DL₅₀, 4 grupos de 15 peces en duplicado, fueron inoculados intraperitonealmente con 0,1 ml de cultivo puro de *Vibrio ordalii* suspendida en una solución salina peptonada (SSP) conteniendo concentraciones decrecientes desde 10⁸ ufc/0,1 ml a 10⁵ ufc/0,1 ml medido por espectrofotometría a una densidad óptica (DO) (600 nm) de 1,19. Los peces se observaron diariamente por 30 días y los peces moribundos y muertos fueron retirados para realizar un examen bacteriológico que confirmara la muerte por *V. ordalii*. La DL₅₀ se determinó según el método de Reed y Muench considerando los acuarios donde se registró más de un 50% de mortalidad y menos del 50% de mortalidad.

La DL₅₀ se determinó en forma directa ya que no se presentó una mortalidad mayor al 50% en ningún grupo y fue de 10⁸ ufc/0,1 ml para Trucha Arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g.

Se concluye que bajo las condiciones de este experimento, la Trucha Arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g es susceptible a una cepa nacional de *Vibrio ordalii*.

Palabras claves: *Oncorhynchus mykiss*, dosis letal 50 (DL₅₀), *Vibrio ordalii*.

2. SUMMARY

DETERMINATION OF THE LETHAL DOSE 50 (LD₅₀) OF A NATIONAL STRAIN OF *VIBRIO ORDALII* IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).

In order to determine the lethal dose 50 (LD₅₀) of a national strain of *Vibrio ordalii* in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings of 70-90 g were obtained from a Vibriosis free fish farm. The fish were transferred and acclimated for one week in 800 litre pool, with constant ventilation and fresh water flow and commercial feeding at 2% live weight. During this time they were sanitarly checked according to the Diagnostic Manual of Aquatic Animal Diseases (OIE 2003) protocol.

Before the study began, the strain of *V. ordalii* known as R157 belonging to an outbreak in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in southern Chile, and kept at the Universidad Austral de Chile's Laboratorio de Ictiopatología cepary, was defrosted and inoculated in 6 fishes of 70-90 g in order to recover their pathogenicity. This process was repeated twice. The bacteria were reisolated from death or dying fishes and cultured in Trypticase Soy Agar (TSA) at 2% NaCl. The fishes were anesthetized with BZ-20 (Etil para-aminobenzoat) through immersion for handling.

To determine the LD₅₀, 4 groups of 15 fishes in duplicate were intraperitoneally inoculated with 0,1 ml of pure cultured *Vibrio ordalii* suspended in peptonated saline solution (PSS) with decreasing concentrations from 10⁸ cfu/0,1 ml to 10⁵ cfu/0,1 ml measure at Optical Density (O.D) (600 nm) 1,19 spectrophotometry. The fishes were observed daily for 30 days and those who were dead or dying were removed to perform a bacteriological exam that confirmed a death by *Vibrio ordalii*. LD₅₀ was determined according to the Reed & Muench's method considering those aquariums were more than 50% and less than 50% of mortality was confirmed.

The LD₅₀ was determined directly because no group present a 50% mortality during experiment, and it was 10⁸ cfu/0,1 ml for 70-90 g for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).

The conclusion of this experiment is that the 70-90 g Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) is susceptible to a national strain *Vibrio ordalii*.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, Lethal Dose 50 (LD₅₀), *Vibrio ordalii*.

3. INTRODUCCIÓN

La Acuicultura en Chile fue comercialmente viable a partir de la década de 1960 con el cultivo de ostras y choritos y la industria del salmón comenzó en la década de los 80. La producción acuícola nacional ha aumentado un 825 % desde 1990 y se espera que continúe creciendo. Este crecimiento fue posible gracias a la abundancia de aguas marítimas e interiores de Chile, al tamaño de su industria pesquera y a su orientación hacia la harina de pescado, principal alimento utilizado en acuicultura, a los costos operacionales relativamente bajos, a la creciente demanda mundial de pescado y al apoyo público en las etapas iniciales de desarrollo (CEPAL /OCDE 2005) entre otras.

Lo anterior ha dado como resultado que Chile sea en la actualidad el segundo productor mundial de salmónidos solo superado por Noruega. La producción Enero – Noviembre de 2005 de salmón del Atlántico fue de 342.891 toneladas netas y la de trucha 106.609 toneladas netas, las cuales reportaron un total de 983,9 y 397,9 millones de dólares (precio FOB), respectivamente. Las principales regiones donde se produce el salmón corresponden a la X y XI (Subpesca 2005).

Sin embargo junto 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 acuicultura nacional (Schäfer y col 1990).

Las enfermedades bacterianas son responsables de grandes mortalidades tanto en peces en estado silvestre como en cautiverio. Se ha determinado que estas enfermedades son principalmente producidas por microorganismos Gram negativos, los cuales pueden actuar como patógenos primarios o ser invasores oportunistas y/o secundarios, causando procesos patológicos en peces susceptibles (Frerichs y Roberts 1989). Entre estas enfermedades la Vibriosis es una de las enfermedades más prevalentes (Actis y col 1999) y generan altas mortalidades en la acuicultura mundial (Egidius 1987) y se ha transformado en la enfermedad económicamente más importante en los cultivos de peces (Actis y col 1999).

La Vibriosis es una enfermedad bacteriana sistémica de peces marinos y de estuario, causada por bacterias de la familia *Vibrionaceae*, género *Vibrio*. Se han descrito brotes de la enfermedad en agua dulce, pero son poco frecuentes (Roberts y Shepherd 1997, Plumb 1999). En general, la Vibriosis es un término utilizado para un grupo de enfermedades bien conocidas reportadas en un gran número de especies marinas de peces. Los brotes de la enfermedad

parecen estar asociados con condiciones medioambientales, especialmente con alzas en la temperatura y no es patógena para animales de sangre caliente (Egidius 1987). Al igual que las aeromonas, el daño al huésped es provocado por acción de sus toxinas (Roberts y Shepherd 1997).

La familia *Vibrionaceae* esta formada por cinco géneros: *Aeromonas*, *Enhydrobacter*, *Photobacterium*, *Plesiomonas* y *Vibrio* (Baumann y col 1984, Holt y col 2000).

El género *Vibrio* está compuesto por bacterias anaerobias facultativas, rectas o curvadas de 0.5-0.3 μm x 1.4- 2.6 μm ., con una ultraestructura típica de una bacteria Gram negativa. Son sensibles al vibriostático 2.4-diamino-6.7-diisopropil pteruidinefosfato (O/129). No son formadores de esporas, fermentan carbohidratos, con la producción de ácido pero no de gas, son ubicuarias y su hábitat natural son los ecosistemas marinos, estuarios y algunas especies pueden ser encontradas en agua dulce (Inglis y col 1993).

Se han descrito alrededor de 34 especies del género *Vibrio* de las cuales 7 se asocian a enfermedades de peces, como patógenos primarios o invasores secundarios (Inglis y col 1993). Sin embargo *V. anguillarum*, *V. ordalli* y *V. salmonicida* son las de mayor patogenicidad en salmonídeos (Plumb 1999).

V. anguillarum fue descrito por primera vez como agente etiológico de la peste roja de las anguilas en 1909 por Bergman en el mar Báltico. Antes de esto, Canestrini en 1893 había descrito epizootias en anguilas migratorias (Egidius 1987, Actis y col 1999). En 1976, Harrell y col. demostraron que existía heterogenicidad en aislados de *V. anguillarum*, lo que llevo a la división de la especie en dos biotipos, 1 y 2 respectivamente (Actis y col 1999). Investigaciones posteriores demostraron que había diferencias fenotípicas y genotípicas entre ambos biotipos (Shiewe 1981 y col) por lo cual el biotipo 2 paso a ser una nueva especie. Esta nueva especie fue nombrada *Vibrio ordalli* en honor a Erling J. Ordal (Actis y col 1999).

La enfermedad causada por *V. anguillarum* ha sido denominada Peste Roja, Furunculosis de Agua Salada, "Boil Disease", Enfermedad de las Úlceras, así como también Vibriosis que es el nombre universalmente aceptado (Austin y Austin 1999).

V. anguillarum forma parte de la microflora normal del medio ambiente acuático, también puede constituir parte de la microflora normal de los peces marinos. Causa infecciones en peces silvestres, pero su mayor impacto es en peces de cultivo, asociado a estrés, disminución del oxígeno disuelto en el agua, alta densidad poblacional, malas condiciones higiénicas y presentándose principalmente en época de verano, cuando las temperaturas sobrepasan los 10°C (Plumb 1999). Este bacilo pertenece al grupo de los vibrios

halófilos y sobrevive a diferentes salinidades. Se ha demostrado su habilidad para sobrevivir en agua de mar por más de 50 meses (Actis y col 1999).

El modo de infección de estos microorganismos no está del todo claro (Austin y Austin 1999), pero puede ocurrir por ingestión de material infectado por otros peces o por heridas en la piel y pérdida de escamas después de clasificación o transporte (Roberts 1981). La infección probablemente comienza con la colonización del tracto gastrointestinal posterior y recto. Esta conclusión resulta de la observación de que *V. anguillarum* ha sido detectado inicialmente en estos sitios (Austin y Austin 1999). Cuando el curso de la enfermedad es peragudo, se describe severa miocardiopatía, necrosis renal y esplénica y edema periorbital o abdominal (Actis y col 1999).

V. ordalii es una de las mayores causas de Vibriosis en salmones silvestres y de cultivo en Estados Unidos y Japón, ocasionando devastadoras pérdidas. Es un bacilo Gram negativo, curvo que mide 2.5-3.0 x 1.0 μ , móvil gracias a un flagelo polar. Presenta sensibilidad al agente vibriostático O/129 (Actis y col 1999, Austin y Austin 1999). El cultivo microbiológico se realiza en agar Tripticasa de Soya (TSA) al 1% de NaCl, por 48 h a 22 °C, donde posteriormente se desarrollan colonias convexas circulares, de color blanco que miden entre 1-2 mm de diámetro (Austin y Austin 1999, Plumb 1999). Bioquímicamente se caracteriza por fermentar la glucosa, ser catalasa y citocromo oxidasa positiva, pero negativa a dihidrolasa arginina, β -galactosidasa, H₂S, indol, no decarboxila lisina, ornitina ni fenilalanina deaminasa (Actis y col 1999, Austin y Austin 1999). Además es negativa a la reacción de Voges-Proskauer y al test de citrato de Simmons y Christensen (Shiewe y col 1981).

El contenido de G-C del DNA de la bacteria es 43-44 % moles. Se ha demostrado mediante estudios de hibridación de DNA: DNA, que existe aproximadamente un 80 % de homología intraespecífica y sólo un 58-69 % de homología con *V. anguillarum* (Shiewe y col 1981). La caracterización molecular de diferentes aislados de *V. ordalii*, revelan la presencia de un plasmidio llamado pMJ101 de 30 kb (Actis y col 1999, Austin y Austin 1999).

El aislamiento e identificación del agente se hace a partir del riñón e hígado sobre agar TSA (Tripticasa de Soya) conteniendo 1% de NaCl incubado a 20-25°C durante 24 a 48 horas. Se caracteriza por formar colonias de color crema, redondas, que miden alrededor de 1 a 2 mm de diámetro (Plumb 1999).

V. ordalii tiene un nicho ecológico más restringido que *V. anguillarum*, siendo aislado solamente de peces y no del sedimento marino (Austin y Austin 1999).

V. ordalii ataca preferentemente la musculatura esquelética y cardíaca, branquias y tracto intestinal. En algunos tejidos infectados, la bacteria puede causar necrosis y hemorragias alrededor de éstos. Este hallazgo indica que la bacteria puede ingresar al huésped mediante la invasión del integumento. Colonias de la bacteria son comúnmente encontradas en el tejido conectivo de branquias, tracto digestivo y ciegos pilóricos. Ocasionalmente se pueden observar microcolonias en hígado y bazo. Salmones juveniles expuestos parenteralmente a esta bacteria, desarrollan una infección sistémica y la bacteria puede ser aislada de hígado, riñón, bazo y sangre inmediatamente después de la inyección. Sin embargo el número de bacilos en el hígado disminuye después de una hora y aumenta a las 22 horas post- infección. Con esto el número de bacterias es alto en todos los órganos y genera una mortalidad de un 100 % durante los 6 días post- infección (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). Los signos son los de un síndrome hemorrágico bacteriano (Actis y col 1999), con palidez de branquias, lesiones hemorrágicas y necróticas en piel, hemorragia ocular, la cavidad corporal se puede encontrar con fluido ascítico sanguinolento, petequias en hígado, riñón, tejido adiposo y en el peritoneo (Plumb 1999).

Las mortalidades debidas a *V. ordalii* y *V. anguillarum* en cultivos de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en varios centros de cultivo en Suecia van en rangos de 0-17%, correlacionado a transporte de peces, tamaño del centro de cultivo y número de años que lleva funcionando (Plumb 1999).

En cuanto a la situación de la Vibriosis en Chile, un estudio del año 1990 cita la importancia en no haber aislado *Vibrio sp.* como tampoco haber observado signología clínica de Vibriosis, lo que permitió concluir que Chile estaba en una situación privilegiada en cuanto a la enfermedad con respecto a otros países (Muñoz 1990). A partir de 2003 se presentan en nuestro país brotes de Vibriosis que afectaron, inicialmente a salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y, posteriormente a Trucha arco iris (*O. mykiss*) y salmón coho (*O. kisutch*), cuya etiología fue *V. ordalii* (Godoy 2004).

La primera descripción de la bacteria en Chile se realizó el año 2004 correspondiendo a 2 brotes en Quellón, en la isla de Chiloé y uno en Lagreze en el área del Archipiélago de las Guaitecas (Colquhoun y col 2004). La bacteria en Chile es un *V. ordalii* atípico, diferente al *V. ordalii* clásico que se presenta en Norteamérica. El nombre de la subespecie chilena está en proceso de definirse en los comités internacionales de taxonomía¹

1.- Aquanoticias, Febrero 2004. Disponible en: <http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=3095> visitado 10/04/2006

Así como ha ocurrido con otras enfermedades es probable que la Vibriosis haya pasado desapercibida, hasta el año 2002. Según datos del Programa de Vigilancia Pasiva del Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), hay reportes de *Vibrio sp.* desde el año 1997 en salmón del Atlántico, Trucha arco iris y salmón coho, lo que indicaría que el patógeno se encontraba adaptándose al huésped y que solo el 2003 se conjugan las condiciones biopatológicas que hacen que la enfermedad se exprese con la alta patogenicidad observada en el último tiempo (Godoy 2004).

Así también, se han aislado otros *Vibrio sp* en Trucha arco iris, salmón del Atlántico y salmón coho (Godoy 2004) y no menor son los brotes de *Vibrio parahaemolyticus* en los últimos dos años, que si bien no es una enfermedad que afecta a los peces, tiene importancia desde el punto de vista de la salud pública. Este brote en la zona de Puerto Montt, junto con el consenso entre los productores de salmón del aumento de la Vibriosis en estos peces, sugiere que se puede estar generando una nueva condición en el sur del país, apropiada para la proliferación y propagación de *Vibrio sp* en una región que era considerada libre (Espejo 2004).

Dentro de las proyecciones del estudio a realizar se quiere determinar la susceptibilidad de Trucha arco iris (*O. mykiss*) a una cepa nacional de *V. ordalii*. Además la determinación de la DL₅₀ de *V. ordalii* permitirá precisar la efectividad de fármacos de uso terapéutico y vacunas.

La Vibriosis es una enfermedad emergente en la X, XI y XII regiones, por lo cual el estudio será importante para el conocimiento, prevención y tratamiento de peces en caso de la aparición de brotes de la enfermedad.

La hipótesis del estudio es que la Trucha arcoiris (*O. mykiss*) es susceptible a una cepa nacional de *V. ordalii* aislada de salmón del Atlántico (*S. salar*)

El objetivo del estudio es reproducir la Vibriosis en Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g mediante la inoculación experimental de una cepa de *V. ordalii* aislada en Chile, reaislar la bacteria inoculada de los peces muertos o moribundos, identificarla por medio de observación microscópica y pruebas bioquímicas y determinar la Dosis letal 50 o media (DL₅₀) en Trucha arco iris (*O. mykiss*).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1. Material biológico

Para la investigación se utilizaron 172 Truchas arco iris (*O. mykiss*) de 70 a 90 g. Los peces utilizados se obtuvieron de una piscicultura sin antecedentes de Vibriosis, los que posteriormente fueron transportados en recipientes plásticos con oxigenación constante (Figura 1) a la Sala de Estanques del Laboratorio de Ictiopatología, perteneciente al Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile.



Figura 1: Transporte de los peces desde la piscicultura hasta la Sala de Estanques en bidones plásticos con oxigenación constante.

Los peces se distribuyeron en diez acuarios de 80 litros de agua con recirculación, aireación constante y con una temperatura promedio de 17°C. La alimentación consistió en una dieta comercial al 2% del peso corporal/día.

Para la inoculación experimental se utilizó una cepa nacional de *V. ordalii* (cepa R157) procedente de un brote en el sur de Chile y que se encuentra en el cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.1.2 Materiales sala de acuarios

- ◆ 10 acuarios de fibra de vidrio.
- ◆ 10 filtros de agua con carbón activado.
- ◆ 10 difusores de aire.
- ◆ 10 termómetros.
- ◆ 10 calefactores de 60 watts.
- ◆ 1 termostato.
- ◆ 1 sistema de emergencia eléctrico.
- ◆ Cloro comercial para desinfección.

4.1.3 Materiales de Laboratorio

Se utilizó material de disección, mecheros, placas Petri, agar TSA 2% NaCl, portaobjetos, bandeja de disección, tinción de Gram, toalla de papel absorbente, alcohol 95% y cloro (6g/l).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Recepción de los peces

Antes de la inoculación los peces fueron mantenidos en un estanque circular con filtro y aireación constante durante una semana para su aclimatación. Se les realizaron chequeos sanitarios según lo estipulado por la Organización Internacional de Epizootias (OIE 2003) a una muestra de 10 peces obtenidos al azar, con el propósito de descartar la presencia de agentes bacterianos que pudiesen alterar los resultados de la investigación (principalmente *Flavobacterium sp* y *Vibrio sp*) y agentes virales citopatogénicos.

4.2.2 Preparación del inóculo

La cepa de *V. ordalii atípico* (cepa R157) fue descongelada y se cultivó en caldo TSA al 2% NaCl. Luego de determinar su pureza se inoculó vía intraperitoneal en 6 Truchas arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g. Posteriormente se realizó un segundo pasaje con el mismo número de peces con el propósito de recuperar la patogenicidad de la bacteria. La dosis inoculada fue de 10^8 bacterias/ml, medido por apreciación visual utilizando el estándar de turbidez Mc Farland (5 Mc Farland). Se procedió a reaislar la bacteria desde el riñón de los peces moribundos y se cultivó en agar TSA al 2% NaCl, incubando a 22°C por 24-48 horas. Se preparó una suspensión bacteriana en solución salina peptonada (SSP) estéril a una densidad óptica (DO)_(600 nm) de 1,190 medida por espectrofotometría² y que determinó una concentración de $1,95 \times 10^9$ unidades formadoras de colonias (ufc)/ml por recuento en placa. Luego a partir de esta concentración se realizaron 4 diluciones en base 10, con las que se inocularon los peces vía intraperitoneal.

4.2.3 Diseño experimental

Todos los peces fueron desafiados en duplicado el día 0, mediante inoculación intraperitoneal de 0,1 ml de solución bacteriana en concentraciones decrecientes de *V. ordalii*. El grupo control se inoculó con 0,1 ml de solución salina peptonada (SSP) estéril. Anterior a la inoculación los peces fueron anestesiados con 50 ppm de BZ- 20®³ (Etil para-aminobenzoato).

Una vez realizada la inoculación, los peces fueron traspasados a acuarios rotulados con la concentración de *V. ordalii* correspondiente.

Cada grupo de peces fue mantenido en acuarios con 80 l de agua salada con una concentración inicial de 10 ‰ de salinidad, que posteriormente se renovó a los tres días, para llegar a un 17 ‰ de salinidad. La mezcla de agua que se utilizó fue agua de mar a 30 ‰ de salinidad, obtenida desde la playa de Calfuco, distante aproximadamente a 25 km de Valdivia. Esta fue diluida con agua dulce obtenida de una vertiente ubicada a pocos metros de la Sala de Estanques. Cada acuario se mantuvo con una temperatura promedio de 17°C y aireación constante, además se colocaron calefactores a los acuarios para alcanzar estas temperaturas y se mantuvieron con un fotoperíodo de 24 horas luz.

2.- Spectronic tipo Génesis 8

3.- Veterquímica Camino a Melipilla 5641 Los Cerrillos, Santiago de Chile.

El método de inoculación fue por vía intraperitoneal descrito también por Cristi (2006) en la línea media ventral en un punto equivalente al largo de una aleta pélvica, craneal a ésta misma, en un ángulo de 90° respecto del pez (Figura 2). La concentración de *V. ordalii* y la distribución de los grupos experimentales se observa en la Tabla 1



Figura 2: Lugar de inoculación vía intraperitoneal con una cepa de *Vibrio ordalii* en Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 gramos.

Tabla 1: Grupos experimentales de Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g en duplicado inoculadas con 0,1 ml de *V. ordalii* según concentración y con solución salina peptonada (SSP).

Grupo experimental	Acuarios (N°)	N° de peces inoculados	Concentración u.f.c/ml	Concentración del inóculo
1	1	15	10 ⁶	10 ⁵ u.f.c/pez
	2	15	10 ⁶	10 ⁵ u.f.c/pez
2	3	15	10 ⁷	10 ⁶ u.f.c/pez
	4	15	10 ⁷	10 ⁶ u.f.c/pez
3	5	15	10 ⁸	10 ⁷ u.f.c/pez
	6	15	10 ⁸	10 ⁷ u.f.c/pez
4	7	15	10 ⁹	10 ⁸ u.f.c/pez
	8	15	10 ⁹	10 ⁸ u.f.c/pez
5	9	15	SSP	SSP
	10	15	SSP	SSP

SSP = Solución Salina Peptonada.

Los acuarios fueron revisados diariamente, controlando temperatura del agua y mortalidad diaria.

4.3 CONFIRMACIÓN DE LA MORTALIDAD POR *Vibrio ordalii*.

A los peces que se presentaron moribundos y/o muertos se les realizaron los siguientes estudios:

- ◆ Examen clínico externo e interno (necropsia)
- ◆ Frotis e improntas de bazo y riñón para la tinción de Gram
- ◆ Reaislamiento e identificación del agente a partir de riñón y bazo
- ◆ Realización de pruebas bioquímicas: formación de gas a partir de glucosa, descarboxilación de lisina y ornitina, arginina dihidrolasa, ONPG (o-nitrophenyl β-D-

galactopyranoside), citrato, Voges-Proskauer, indol, gelatina, hidrólisis de almidón, oxidasa, reducción de nitrato, fermentación de sucrosa, lactosa, celobiosa y salicina.

Para la realización del examen externo, se consideraron principalmente estado de la piel (coloración), aletas, ojos, branquias y opérculo.

Posterior al examen externo se realizó el examen interno, siguiendo la técnica de necropsia descrita por la American Fisheries Society (1992), que consiste, brevemente, en corte de aleta pectoral izquierda por la base mediante el uso de tijeras, introducción de la punta de la tijera en la base de la aleta, corte dorso-ventral hasta la línea media siguiendo el curso de ésta hasta poco antes del poro anal, luego corte dorso-craneal siguiendo la línea lateral y posteriormente un corte dorso-ventral posterior al opérculo, desprendimiento de la pared ventro-lateral y observación de los órganos internos, teniendo en consideración rasgos tales como: color y consistencia, hemorragias, inflamación, pústulas, nódulos y la presencia o ausencia de alimentos o mucus en el estómago e intestino.

Se realizaron improntas de bazo y riñón para tinción de Gram y extendidos de sangre para realizar tinción de Giemsa.

Para el aislamiento bacteriano se tomaron muestras de riñón y bazo de los peces moribundos y/o muertos con un asa estéril y se sembraron mediante estrías en placas de agar TSA al 2% de NaCl. La temperatura de incubación fue de 23-24°C. Las colonias que presentaron características morfológicas similares a *V. ordalii* fueron sometidas a pruebas bioquímicas, con el propósito de confirmar su clasificación taxonómica.

Al finalizar el desafío experimental, los peces vivos fueron sacrificados con sobredosis de BZ-20[®] (Etil para-aminobenzoato) y posteriormente fueron sometidos a exámenes de necropsia y aislamiento bacteriano desde riñón y bazo.

4.4 MÉTODO DE CÁLCULO PARA LA DL₅₀.

La DL₅₀ corresponde a la inoculación de una dilución de suspensión bacteriana en la cual el 50% de los animales en experimentación se mueren.

Para la realización del cálculo de la DL₅₀ se utilizó la fórmula de Reed y Muench, teniendo sólo en cuenta los valores próximos al 50% de mortalidad y el logaritmo del

incremento de las dosis adyacentes a dicho 50% (Jurado 1989, Villegas 1998). De esta forma se calculó el factor de distancia proporcional, quedando de la siguiente forma:

$$\text{Distancia proporcional (DP)} = \frac{\text{mortalidad} > 50\% - 50\%}{\% \text{ mortalidad} > 50\% - \% \text{ mortalidad} < 50\%}$$

DL_{50} = (log dilución con más de 50% mortalidad) + (distancia proporcional x log dilución).

Factor de dilución = 10

Logaritmo (log) dilución = 1

4.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las mortalidades diarias y acumuladas de los grupos experimentales se toman como promedios de los acuarios, expresadas en porcentaje y se presentan mediante cuadros y figuras.

5. RESULTADOS

5.1 MORTALIDAD

Las mortalidades fueron observadas diariamente durante 30 días. El mayor número de mortalidades se concentró durante los primeros 4-6 días post inoculación (p.i), presentándose en los peces inoculados con una concentración mayor del inóculo (10^7 y 10^8 ufc/0,1 ml).

Las mortalidades totales se agruparon en la tabla 2 según la dosis del inóculo.

Tabla 2: Mortalidad (total y porcentaje) asociada a *V. ordalii* según dosis inoculada intraperitonealmente en Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g a una temperatura promedio de 17°C y 17 ‰ de salinidad.

Grupos	Acuarios (N°)	Dosis ufc/0,1 ml	N° de peces inoculados	Mortalidad	Mortalidad %
1	1+2	10^5	30	4	13.3
2	3+4	10^6	30	4	13.3
3	5+6	10^7	30	8	26.6
4	7+8	10^8	30	15	50
5	9+10	SSP	30	0	0

En el grupo 4 (10^8 ufc/0,1 ml) la mortalidad comenzó al día siguiente de la inoculación y se detuvo el día 20 p.i, llegando a un total de 15 peces. El mayor número de mortalidad se registró entre los días 2 y 4 p.i con un total de 10 peces muertos.

En el grupo 3 (10^7 ufc/0,1 ml) comenzó la mortalidad a partir del día 3 p.i, siendo este día el de mayor mortalidad con un total de 6 peces muertos. Posteriormente murieron dos peces, uno el día 6 y el otro el día 30 p.i.

En los grupos 1 y 2 la mortalidad acumulada fue exactamente igual entre ambos grupos (Tabla 2). La mortalidad comenzó el día 3 post inoculación en ambos grupos de peces y terminó el día 28 para el grupo 1 y 25 para el grupo número 2. La mortalidad acumulada para ambos grupos fue de un 13,3% para cada grupo, lo que corresponde a 4 peces muertos (Figura 3)

El grupo control registró un solo muerto el día 6 p.i, no pudiendo recuperarse bacterias tanto del cultivo de riñón, frotis de sangre e improntas de bazo y riñón, por lo que se consideró como mortalidad inespecífica.

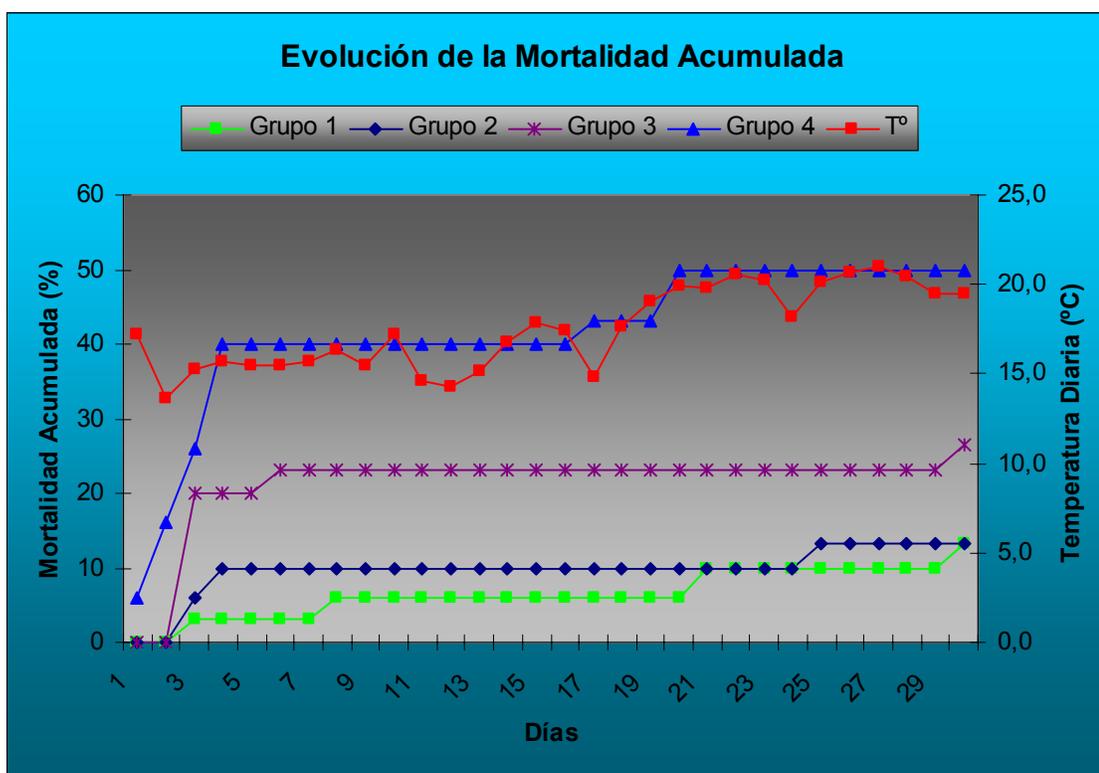


Figura 3: Evolución de la mortalidad por grupo experimental durante 30 días en Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 g, inoculados vía intraperitoneal con una cepa de *V. ordalii*, a una salinidad de 17‰.

5.2 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos que evidenciaron los peces enfermos fueron: descamación, letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia uni o bilateral (Figura 4a), palidez branquial, hemorragias en la cavidad bucal, en la base de las aletas y orificio anal (Figura 4b). Algunos peces presentaron edema y hemorragia ocular, lesiones hemorrágicas a nivel del pedúnculo caudal, erosiones hemorrágicas a nivel de la aleta dorsal y aumento del volumen abdominal con alteración de la natación.

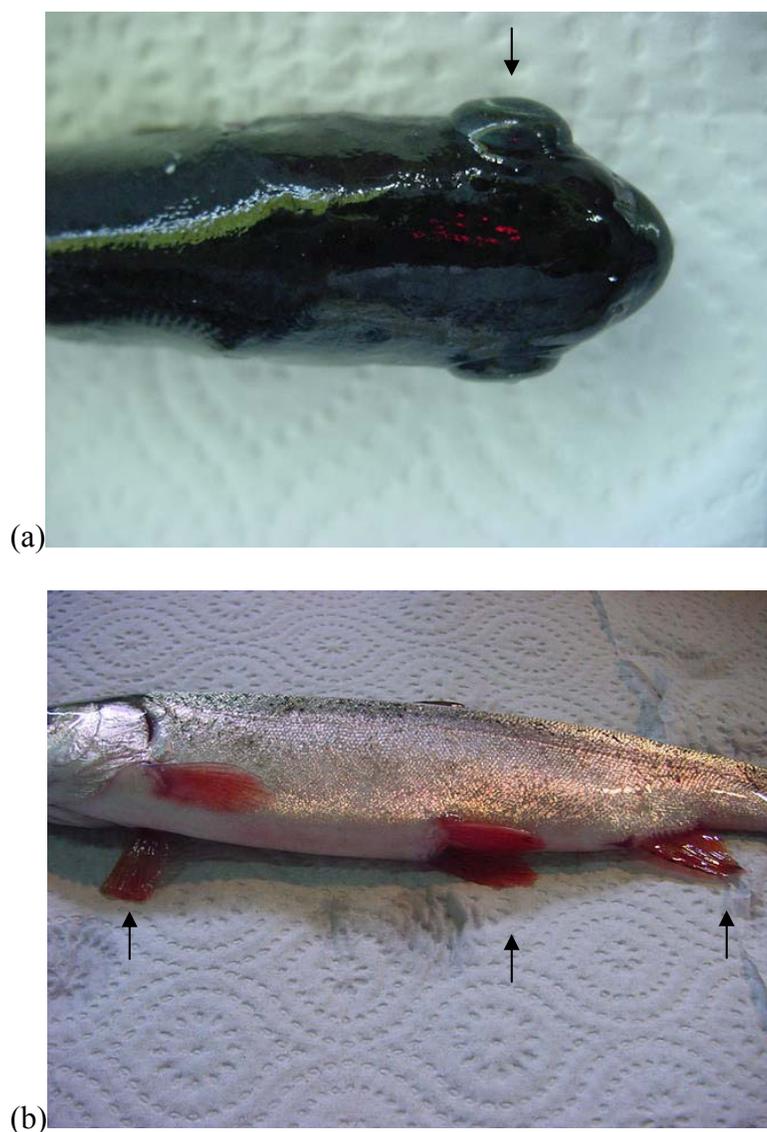


Figura 4: Signología clínica de *V. ordalii* presentada durante el estudio: exoftalmia, dorso oscuro (a); aletas pectorales, pélvicas y anal hiperémicas (b).



Figura 5: Lesiones internas: hígado pálido (↓), esplenomegalia (→), cavidad abdominal hemorrágica (↗) grasa abdominal hemorrágica (←), enteritis hemorrágica (↑).

La signología interna (Figura 5) consistió principalmente en esplenomegalia y hemorragia en cavidad abdominal, petequias en la grasa abdominal y de ciegos pilóricos, enteritis, hemorragias en la musculatura abdominal. En algunos individuos se pudo apreciar hígado pálido, enteritis hemorrágica y hemorragias en la superficie de la vejiga natatoria.

5.3 DIAGNÓSTICO

Se consideraron muertos por *V. ordalii* todos los peces que al examen clínico presentaron signos de la enfermedad, junto con el posterior reaislamiento de la bacteria desde riñón y bazo. La confirmación del agente causal se realizó mediante la detección de colonias típicas, tinción de Gram y pruebas bioquímicas (Anexo 1, pruebas bioquímicas).

A partir de riñón y bazo de los peces enfermos se reaisló *V. ordalii* y se sembró en agar TSA al 2% NaCl a 23-24 °C. Posteriormente, se incubó durante 48 horas, después de las cuales se obtuvieron colonias blancas pequeñas, translúcidas, circulares, convexas y viscosas.

Se realizaron improntas de bazo y riñón para tinción de Gram, lo que dió como resultado la presencia de bacilos pleomórficos Gram negativos en estos órganos.

No se logró reaislar *V. ordalii* de ninguno de los peces sobrevivientes sacrificados el día 30 del experimento, así como tampoco desde peces del grupo control.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀

Una vez determinadas la mortalidad de los peces desafiados, se determinó que la dosis de 10^8 ufc/0,1 correspondió a un 50% de mortalidad. Por lo tanto la DL₅₀ para Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de 70-90 gramos inoculados intraperitonealmente con *Vibrio ordalii atípico* a una T° promedio de 17°C y un 17‰ de salinidad es de **10^8 ufc/0,1 ml.**

6. DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue reproducir la Vibriosis, a partir de una cepa de *V. ordalii* aislada en Chile y mantenida en el cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile denominada R157, y determinar la Dosis Letal 50 o media (DL₅₀) para Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70- 90 g. Para ello se realizó una inoculación experimental vía intraperitoneal de estos peces y se observó el curso de la enfermedad durante 30 días a partir del día de inoculación.

La cepa en estudio fue la misma que la utilizada en los estudios de Paredes (2005) y Treuquemil (2005). Fue descongelada e inoculada previamente en 6 peces en dos pasajes para recuperar su patogenicidad. Esto se realizó ya que cuando se mantienen patógenos en cultivos de laboratorio y no se hacen pasajes en animales durante largos períodos de tiempo, a menudo su virulencia disminuye e incluso se pierde totalmente (Brock y col 1998). Esta cepa fue identificada como *V. ordalii* atípico por sus características fenotípicas, genéticas y bioquímicas (Colquhoun 2004, Godoy 2004, Paredes 2005, Treuquemil 2005). La cepa fue aislada a partir de peces durante un brote de Vibriosis en salmónes del Atlántico (*S. salar*), ocurrido a fines del 2003 en el sur de Chile (Chiloé) (Treuquemil 2005).

La vía de inoculación se escogió siguiendo los experimentos de Treuquemil (2005) para *V. ordalii* y Díaz (2003) para *Aeromonas salmonicida* subespecie *achromogenes*, ambos estudios realizados en salmón del Atlántico (*S. salar*). Esta vía de inoculación tiene la ventaja que permite conocer el número de bacterias que ingresó al organismo (Michel 1980). Además, esta es la vía y el lugar de inoculación de preferencia para probar vacunas y para la aplicación de estas en forma comercial. Pero con la desventaja que es una vía que sobrepasa los mecanismos normales de defensa del pez en forma artificial, por lo que no se asemeja a la infección natural del pez, lo que si ocurriría en una infección experimental vía baño (Amend 1981, Treuquemil 2005). Esta tiene la desventaja que es muy difícil que todos los peces reciban la misma dosis bacteriana y por lo tanto no se puede determinar la dosis exacta individual (Paredes 2005).

En relación al volumen de inóculo utilizado (0,1ml) este coincide con un desafío utilizando otra bacteria del Género *Vibrio* (Austin y Austin 2003), dos desafíos con *A. salmonicida* (Díaz 2003, Quinteros 2004) y dos desafíos realizados con *V. ordalii* (Paredes 2005, Treuquemil 2005). Asimismo este volumen corresponde al usado en la inoculación de vacunas a los peces en producción intensiva.

Para el grupo control se utilizó una solución salina peptonada (SSP) a diferencia de estudios anteriores en los cuales se utilizó una solución salina estéril al 1,5% NaCL (Paredes 2005, Treuquemil 2005). Esta variación se utilizó en este estudio porque la primera produce menos irritación que la segunda⁴, además de ser la solución en la cual se diluyó la bacteria.

Los grupos contenían dos acuarios cada uno, pero para el cálculo de los resultados se utilizó el protocolo dado por Amend (1981) que establece para el cálculo de resultados se tienen que tomar las mortalidades por grupo y no por acuario en forma individual.

Las mortalidades acumuladas obtenidas en este trabajo fueron de 50% para la dilución más alta de 10^8 ufc/0,1 ml por pez y de 13,3 % para la dilución mas baja de 10^5 ufc/0,1 ml por pez, obteniendo mortalidades para todos los grupos (4 grupos), lo que confirma la capacidad de la cepa para producir la enfermedad en Trucha arco iris (*O. mykiss*)

Para los grupos 1 y 2 inoculados con la dosis 10^5 ufc/0,1 ml y 10^6 ufc/0,1 ml respectivamente, la mortalidad acumulada correspondió a un 13,3 %, cifra que se encuentra dentro de los rangos de presentación de Vibriosis en Chile, como lo señala Godoy (2004) y que corresponde a un rango de 5-22 % de mortalidad acumulada.

Si bien las mortalidades son más bajas que las obtenidas en otros estudios, hay que señalar que se utilizaron peces de 70 a 90 gramos lo que puede influir en el resultado del experimento. Esto concuerda con lo señalado por Amend (1981) en su trabajo de criterios para pruebas de potencia en vacunas, donde hace mención a que peces más grandes son generalmente más resistentes a las enfermedades.

Por otra parte solo se realizaron 2 pasajes de reactivación de la bacteria, a diferencia de lo realizado por Díaz (2003) que lo hizo con 5 pasajes y Treuquemil (2005) que lo hizo con 3 pasajes. Este cambio en el protocolo, sumado al hecho de que se trata de especies distintas puede haber influido en la patogenicidad de la bacteria.

Díaz (2003) da un detalle de la susceptibilidad de las distintas especies de salmónidos a la Furunculosis (*A. salmonicida* subespecie *achromogenes*) bacteria que, como ya se mencionó, pertenece a la familia *Vibrionaceae*. En ella las especies ordenadas de mayor a menor susceptibilidad fueron: salmón del Atlántico (*S. salar*), Trucha café (*S. trutta lacustris*), Trucha de arroyo (*S. trutta trutta*) y por último la Trucha arco iris (*O. mykiss*). Asimismo, Secombes y Olivier (1997) describen que la DL_{50} para *A. salmonicida* en Trucha arco iris (*O. mykiss*) es de 10^3 a 10^4 ufc, mientras que para salmón del Atlántico (*S. salar*),

4.- Comunicación personal con la Sra. Mónica Monrás, Instituto de Patología Animal Universidad Austral de Chile (UACH).

Trucha café (*S. trutta lacustris*) y Trucha de arroyo (*S. trutta trutta*) la DL₅₀ es de menos 100 ufc. Con esto podríamos deducir un grado mayor de resistencia también hacia *V. ordalii* por parte de la especie en estudio, Trucha arco iris (*O. mykiss*), sumado al hecho que la cepa bacteriana utilizada corresponde a un brote en salmón del Atlántico (*S. salar*).

La temperatura del agua se verificó diariamente durante los 30 días que duró el estudio, pasando de los 13,6 °C de promedio al día 1, hasta los 19,8 °C de promedio el último día, con un promedio general de los 30 días de estudio de 17,3 °C. Es importante señalar que también influyó la temperatura ambiental, inusualmente calurosa para la época del año, la cual pudo haber influido en la temperatura en la sala de acuarios (Anexo 2, temperaturas), ya que hubo días en que la temperatura de los estanques tuvo promedios de hasta 20,8 °C. La temperatura del agua es un factor muy importante ya que esta enfermedad se presenta principalmente en época de verano, cuando las temperaturas sobrepasan los 10°C (Plumb 1999), asociado también a la calidad del agua, virulencia de la cepa bacteriana y estrés en los peces (Actis y col 1999). Además desde el punto de vista del pez por ser animales poiquiloterms, sus procesos fisiológicos están moderados por la temperatura del agua (Kennedy-Stoskopf 1992), por lo tanto la modulación de la respuesta inmune es igualmente dependiente de la temperatura. Numerosos estudios han demostrado que las bajas temperaturas deprimen los mecanismos de defensa no específicos, humoral y celular (Kennedy-Stoskopf 1992).

La salinidad también fue aumentando desde 10‰ hasta llegar a 17‰ lo que contribuyó a que las mortalidades comenzaran el día 1 con una concentración mayor los días 3 y 4, situación que coincide con los resultados de Díaz (2003) y Treuquemil (2005).

Aunque se presentó mortalidades en la primeras 24-48 horas, estas se concentraron entre los días 3 y 6, finalizando el día 21. Esporádicamente se registraron mortalidades entre los días 22 y 30 (Anexo 3). Paredes (2005) describe mortalidades entre los días 6 y 16 con un 65 % de mortalidad acumulada para *V. ordalii* vía IP. También menciona un trabajo del Laboratorio Alharma donde se inocula *V. ordalii* vía IP a salmón del Atlántico (*Salmo salar*), con un 100% de mortalidad, aunque señala que el laboratorio no informa las dosis ni las condiciones en las que se llevó a cabo este desafío (Paredes 2005).

El curso de la enfermedad fue de tipo agudo o subagudo, según la clasificación entregada por Alvarado y col (1989). Las mortalidades se presentaron entre 24-48 horas desde que los peces presentaban los signos clínicos. Los peces se presentaron letárgicos, con oscurecimiento del dorso, anorexia y hemorragias en la base de las aletas y ano, signología también observada en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con diagnóstico de Vibriosis en el sur de Chile por Godoy (2004) y por el desafío realizado por Treuquemil (2005).

La signología interna consistió principalmente en esplenomegalia y hemorragia en cavidad abdominal, petequias en la grasa abdominal y de ciegos pilóricos, enteritis, hemorragias en la musculatura abdominal. En algunos individuos se pudo apreciar hígado pálido, enteritis hemorrágica, hemorragias en la superficie de la vejiga natatoria y cavidad bucal hemorrágica similar a lo descrito en la literatura (Plumb 1999) y en los casos de Vibriosis en Chile (Godoy 2004, Treuquemil 2005).

A diferencia de lo ocurrido en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), sí fue posible evidenciar lesiones en la piel en 2 peces, los cuales pertenecían a los estanques con la dilución mas baja 10^5 ufc/0,1 ml, signología clínica característica de Vibriosis por *V. ordalii* que presentan los peces naturalmente infectados (Actis y col 1999) cuando la enfermedad tiende a la cronicidad, lo que coincide con este estudio, ya que estos peces se encontraron el día 8 y 20 p.i (Anexo 3).

El reaislamiento de la bacteria fue obtenido desde muestras de riñón. También en algunos casos se obtuvo cultivos bacterianos desde el bazo, lo que puede corresponder a un aislamiento por vecindad con punto de inoculación, no así en el caso de los 2 primeros peces muertos a los cuales se les realizó cultivo de sangre, con resultados positivos, lo cual indicaría una bacteremia. En el resto de los peces no fue posible aislar desde la sangre. Este hallazgo podría indicar una bacteremia por *V. ordalii* en Trucha arco iris (*O. mykiss*) muy rápida y transitoria. Ocasionalmente bajos conteos bacterianos pueden ser observados durante los estados iniciales de la infección (Actis y col 1999). Asimismo Actis y col (1999) señalan un estudio en salmones juveniles expuestos a un desafío experimental, en que desarrollaron una infección sistémica y la bacteria fue recuperada desde el hígado, riñón, bazo y sangre inmediatamente después de la infección, sin embargo el número de bacterias declina en el hígado después de una hora p.i y se incrementa 22 horas p.i en todos los órganos (Actis y col 1999).

Tanto para el reaislamiento desde sangre como de bazo y riñón se realizó cultivo en Agar TSA al 2% de NaCl a 22-23 °C por 7 días. La confirmación del agente se realizó por medio de repique de colonias en Agar TSA 2% NaCl a 24 °C por 3-4 días obteniendo colonias circulares, brillantes, convexas y grisáceas, a las cuales se les comprobó motilidad en microscopio de campo oscuro, tención de Gram, test de sensibilidad al agente vibriostático O/129⁵ y pruebas bioquímicas.

La utilización de improntas de bazo y riñón contribuyó también al diagnóstico rápido de la enfermedad. Se pudo observar bacterias Gram negativas de forma bacilar, las que sin lugar a dudas y con el apoyo de cultivos y pruebas bioquímicas, correspondía a *V. ordalii*.

El uso de pruebas bioquímicas permitió comprobar que la cepa en estudio corresponde a *V. ordalii* atípico inoculado. La única diferencia con *V. ordalii* clásico fue la trehalosa que resultó ser positiva, resultados similares a los obtenidos por Colquhoun y col (2004) y Treuquemil (2005) y que difieren del *V. ordalii* clásico el cual es trehalosa negativo (Schiewe y col 1981).

Al igual que en otros estudios, a partir de los peces sobrevivientes no fue posible reaislar la bacteria en muestras de riñón, por lo que se puede deducir que el sistema inmune de éstos peces fue capaz de resistir la infección intraperitoneal por *V. ordalii* (Treuquemil 2005).

La DL_{50} se calculó según el método de Reed y Muench (Jurado 1989, Villegas 1998), la cual toma dos grupos, uno que presente mortalidades superiores a 50% y otro con mortalidades inferiores a 50%. Los resultados obtenidos en este estudio no superaron el 50% de mortalidad en ningún grupo, por lo tanto sin tener punto máximo de mortalidad no es aplicable el método mencionado, determinándose directamente la DL_{50} en alrededor de 10^8 ufc/0,1 ml para Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 gramos inoculado vía intraperitoneal, recomendándose para estudios posteriores aumentar en un logaritmo la dosis para realizar un cálculo mas exacto de este parámetro.

Esta cepa presentó la patogenicidad necesaria para producir mortalidad en Trucha arco iris (*O. mykiss*). Este estudio continúa lo realizado por otros investigadores en salmón del atlántico (*S. salar*) pero es el primero en Chile en Trucha arco iris (*O. mykiss*).

CONCLUSIONES

La Vibriosis puede ser reproducida en Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 gramos mediante inoculación intraperitoneal con una cepa nacional de *Vibrio ordalii* aislada de salmón del atlántico (*S. salar*), en consecuencia se acepta la hipótesis planteada.

La DL_{50} determinada fue cercana a las 10^8 ufc/0,1 ml para la cepa en estudio, en Trucha arco iris (*O. mykiss*) de 70-90 gramos, a una temperatura promedio de 17° C y una salinidad de 17 ‰.

El cuadro presentado fue de forma aguda, con las primeras mortalidades entre las 24- 48 horas p.i. Los signos clínicos y mortalidades originados por *V. ordalii* se presentaron a partir del día 3 p.i.

7. BIBLIOGRAFÍA

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

Alvarado V, Schäfer W, Enríquez R, Monrás M. 1989. Curso de Postgrado. Enfermedades en Peces y sus técnicas Diagnósticas. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.

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. Ed. 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 del Valle. Capitulo 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 (revised). Ed. Praxis. United Kingdom.

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

Brock TO, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1998. Brock Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Ed. Prentice Hall. Madrid.

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

Cristi RC. 2006. Evaluación de campo de la eficiencia de dos vacunas comerciales para la prevención de la Vibriosis en Chile provocada por *Vibrio ordalii* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Díaz CP. 2003. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de una cepa nacional de *Aeromonas salmonicida* subs. *Achromogenes* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

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

Espejo R. 2004. Diciembre. *Vibrio parahaemolyticus*: Patógeno que emerge en aguas del Sur de Chile. *Mundo Acuícola*, Año 2. 22: 8-9.

Frerichs GN, Roberts RJ. 1989. The Bacteriology of Teleosts. En Roberts RJ (ed). *Fish pathology*. Balliere Tindall. Second edition. Pp 289-302. Ed. W.B. Sanders London.

Godoy M. 2004. Salmónidos afectados por Vibriosis en Chile. *Revista AquaNoticias*, Fundación Chile. 91: 88-91.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Stanley JT, Williams ST. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Estados Unidos.

Inglis V, Bromage NR, Roberts RJ. 1993. *Bacterial diseases of fish*. Ed. John Wiley & Sons, New York. (Cap 6) Estados Unidos.

Jurado R. 1989. Concepto de Toxicidad Aguda, Crónica y Remota. Metodología de la Determinación de la DL₅₀. En Jurado R (ed). *Toxicología Veterinaria*. 2º edición. Pp 40-45. Salvat Editores S.A.

Kennedy- Stoskopf S. 1992. Immunology. En Stoskopf M (ed). *Fish Medicine*. Pp 149-159. W.B Saunders Company Hartcourt Brace Jovanovich Inc.

Michel C. 1980. A Standardized Model of Experimental Furunculosis in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 746-750.

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

Organización Internacional de Epizootias (O.I.E.), 2003. Diagnostic Manual of Aquatic Animal Diseases. Forth edition. Paris. Francia.

Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), Comisión Económica para América Latina y El Caribe (CEPAL). 2005. Evaluaciones de desempeño ambiental Chile 2005. Publicación conjunta de la OCDE y CEPAL.

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.

Plumb JA. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. First edition, Ed. Iowa Estate University. Iowa. Estados Unidos.

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.

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

Roberts RJ, Shepherd CJ. 1997. Handbook and Trout and Salmon Diseases. Third edition. Ed. Fishing New Books. London.

Secombes CJ, Olivier G. 1997. Host-Pathogen Interactions in Salmonids. En Bernoth EM, Ellis EA, Midtlyng PJ, Olivier G, Smith P (eds). *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research*. Pp 269-296. Ed. Academic Press, Londres, Inglaterra.

Schäfer M, Alvarado V, Enríquez R, Monrás M. 1990. The Coho Salmon Syndrome (CSS): a new disease in Chilean salmon reared in sea water. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 10:130.

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

Subsecretaría de Pesca (SUBPESCA) Gobierno de Chile. 2005. Informe Sectorial de Pesca y Acuicultura Diciembre 2005.

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.

Villegas P. 1998. Titration of Biological Suspensions. En The American Association of Avian Pathologists (eds). *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Pp 248-254. Forth Edition. Pensilvania. Estados Unidos.

8. ANEXOS

Anexo 1: Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a partir de colonias representativas de *V. ordalii* aisladas de cultivos de riñón en agar TSA al 2% NaCl a 23-24 °C en Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculados con 10⁸ ufc/0,1 ml y mantenidos a 17 °C y 17 ‰ de salinidad.

Característica	<i>V. ordalii</i> atípico aislado en Chile	<i>V. ordalii</i> clásico (Shiewe y col 1981)
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	+	+
Producción de ácido de:		
Arabinosa	-	-
Celobiosa	-	-
Galactosa	-	-
Lactosa	-	-
Manitol	-	-
Ramnosa	-	-
Salicina	-	-
Sorbitol	-	-
Trehalosa	+	-
Xilosa	-	-

(+) = positivo
(-) = negativo

Anexo 2: Registro diario de temperatura (AM y PM) del agua de los acuarios de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) desafiados con *V. ordalii* y mantenidos a una salinidad de 17 ‰ para determinar la DL₅₀.

Días post inoculación	Temperatura (°C)		Temperatura Promedio Día (°C)
	AM	PM	
1	15,7	18,7	17,2
2	12,2	15,1	13,7
3	14,4	16,1	15,2
4	14,9	16,4	15,7
5	15,4	15,6	15,5
6	15,3	15,7	15,5
7	15,4	16,1	15,7
8	15,4	17,3	16,3
9	14,4	16,6	15,5
10	16,7	17,8	17,2
11	13,5	15,8	14,7
12	12,9	15,6	14,3
13	13,6	16,8	15,2
14	16,1	17,4	16,8
15	17,4	18,4	17,9
16	15,8	19,2	17,5
17	15,3	14,4	14,9
18	16,7	18,6	17,6
19	18,0	20,0	19,0
20	18,4	21,4	19,9
21	17,9	21,8	19,8
22	18,4	22,6	20,5
23	19,1	21,3	20,2
24	18,8	17,6	18,2
25	18,4	21,9	20,2
26	19,5	21,9	20,7
27	19,8	22,1	21,0
28	19,7	21,2	20,5
29	17,7	21,2	19,5
30	18,3	20,7	19,5
Promedio	16,5	18,5	17,5

Anexo 3: Mortalidad diaria total en Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de 70-90 g inoculadas vía Intraperitoneal con una cepa nacional de *V. ordalii*.

Mortalidad Diaria Total										
Grupos	1		2		3		4		Control	
Acuario nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº peces	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Días p.i										
1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
3	1	-	-	2	6	-	3	-	-	-
4	-	-	1	-	-	-	-	4	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
21	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Total Acuarios	3	1	2	2	6	2	5	10	0	1
Total Grupos	4		4		8		15		1	

9. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Enríquez, Sra. Mónica Monrás, Dra. Vania Quinteros y Sr. Esteban Henríquez por todo su apoyo, conocimientos y confianza depositados.

A mis amigos, toda esa gente que me acompañó desde el primer año (y de años subsiguientes) y que formaron parte de lo que yo consideraré una gran familia: Pescado, Mario, Gatica, Hernán, Cosmelli, Carlos Madrid, Natasha, Vivi, de Groote, Carola Solis, Lilo, Cristóbal, Francisquito, Molina, Yoyo, Cesar, Karen, Anita, Loreto, Andrea, Lorena, Ceci, Carola, Eduardo, Yerko Mena, Hector, Teté. Gracias por dejarme conocerlos un poco.

A Gabriela por toda su compañía, cariño, comprensión y paciencia. Ella se llevó lo peor de esto. Gracias por soportar mis mañas.

A mi familia, en especial Lorena, Tatán y Josefina, por todo su cariño y apoyo.

Finalmente a mis padres Luis y Eugenia, por todo su amor, apoyo, sacrificio y fundamentalmente por su paciencia. Nada de esto sería posible sin ellos.

Y a todos los que se me olvidaron, muchas gracias...