

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

**DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL<sub>50</sub>) DE UNA CEPA NACIONAL DE  
*FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* EN TRUCHA ARCOIRIS  
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*).**

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

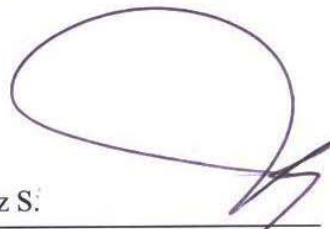
**DORIS PAMELA MEIXNER MANSILLA**

**VALDIVIA – CHILE**

**2007**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Dr. Ricardo Enríquez S.



Nombre

Firma

**COLABORADOR**

Sra. Mónica Monrás S.



Nombre

Firma

**PROFESORES CALIFICADORES**

Dr. Elías Caballero V.



Nombre

Firma

Dr. Orlando Garrido O.



Nombre

Firma

**FECHA DE APROBACIÓN**

**21 de noviembre de 2007**

*Dedicado a mis padres Edilia y Heriberto.*

## ÍNDICE

| Capítulo                   | Página |
|----------------------------|--------|
| 1. RESUMEN.....            | 1      |
| 2. SUMMARY.....            | 2      |
| 3. INTRODUCCIÓN.....       | 3      |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 9      |
| 5. RESULTADOS.....         | 15     |
| 6. DISCUSIÓN.....          | 19     |
| 7. BIBLIOGRAFÍA.....       | 24     |
| 8. ANEXOS.....             | 29     |
| 9. AGRADECIMIENTOS.....    | 33     |

## 1. RESUMEN

Con el objetivo de determinar la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de una cepa nacional de *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se obtuvieron alevines entre 15 - 40 g desde un lote sin antecedentes de Flavobacteriosis. Durante el período de aclimatación fueron sometidos a un chequeo sanitario de acuerdo a protocolo del Manual de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos (OIE 2006). La cepa bacteriana se obtuvo del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática de la Universidad Austral de Chile.

Al inicio del estudio, se realizaron cuatro pasajes *in vivo* de la bacteria para recuperar su patogenicidad. De los peces muertos y moribundos se reisoló la bacteria desde riñón en agar TYES. Para la determinación de la DL<sub>50</sub>, cuatro grupos de 30 peces en duplicado, fueron inoculados vía intramuscular y subcutánea con 0,1 ml de un cultivo puro de *F. psychrophilum* suspendida en PBS, en concentraciones decrecientes desde 10<sup>7</sup> ufc/pez hasta 10<sup>4</sup> ufc/pez, medido por espectrofotometría a una densidad óptica de 0,21 (D.O<sub>600 nm</sub>). Los peces se observaron diariamente por 30 días y durante este período cada pez muerto o moribundo fue retirado del acuario para realizar examen bacteriológico y confirmar la muerte por *F. psychrophilum*.

Se logró reproducir la Flavobacteriosis sólo en los peces inoculados vía intramuscular. Con dosis de 10<sup>7</sup> ufc/pez y 10<sup>6</sup> ufc/pez las mortalidades acumuladas fueron de un 66,6 y 16,6 % respectivamente. Los signos clínicos externos más notorios fueron: oscurecimiento de la piel, exoftalmia y lesiones musculares; internamente marcada esplenomegalia, palidez renal y hepática.

La DL<sub>50</sub> fue calculada mediante la fórmula de Reed y Muench (Michel y García 2003), considerando los grupos de peces donde la mortalidad fue superior a un 50 % e inferior a un 50 % y corresponde a **10<sup>7,33</sup> ufc/ml** para trucha arcoiris (*O. mykiss*) entre 15 - 40 g, inoculadas vía intramuscular, mantenidas a una temperatura promedio de 10,7 °C, durante 30 días de experimentación.

Se concluye bajo las condiciones de este experimento que trucha arcoiris (*O. mykiss*) es susceptible a una cepa nacional de *F. psychrophilum* inyectada vía intramuscular y no por vía subcutánea.

Palabras clave: *Flavobacterium psychrophilum*, dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), trucha arcoiris.

## 2. SUMMARY

### **DETERMINATION OF THE LETHAL DOSE 50 (LD<sub>50</sub>) OF A CHILEAN STRAIN OF *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*).**

In order to determine the lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) of a national strain of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings of 15 - 40 g were obtained from a Flavobacteriosis free fish batch. During the week of acclimatization they were sanitarily checked according to the Diagnostic Manual of Aquatic Animal Diseases (OIE 2006) protocol. The bacterium strain was obtained from Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática de la Universidad Austral de Chile.

To the beginning of the study, four *in vivo* passages of the bacterium were realized in trout in order to recover their pathogenicity. The bacteria were reisolated from death or dying fishes in TYES agar from kidney. To determine the LD<sub>50</sub>, 4 groups of 30 fishes in duplicate were intramuscular and subcutaneously inoculated with 0,1 ml of pure cultured *F. psychrophilum* suspended in buffer phosphate saline solution (PBS) with decreasing concentrations from 10<sup>7</sup> cfu/fish to 10<sup>4</sup> cfu/fish measure at Optical Density (O.D<sub>600 nm</sub>) 0,21 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 *F. psychrophilum*.

Flavobacteriosis could be reproduce only in the inoculated fish by intramuscular route. With doses of 10<sup>7</sup> and 10<sup>6</sup> cfu/fish the accumulated mortalities was 66,6 and 16,6 % respectively. The most frequent clinical signs were skin darkening, exoftalmia and muscular lesions; internally splenomegalia, pale kidney and liver.

LD<sub>50</sub> was determined according to the Reed & Muench's method (Jurado 1989, Villegas 1998) considering those aquariums were more than 50 % and less than 50 % of mortality was confirmed. The LD<sub>50</sub> calculated was 10<sup>7,33</sup> cfu/ml in 15 - 40 g rainbow trout (*O. mykiss*), intramuscular inoculated, supported to an average temperature of 10,7 °C, for 30 days of experimentation.

The conclusion of this experiment is that the 15 - 40 g rainbow trout (*O. mykiss*) is susceptible to a national strain of *F. psychrophilum* intramuscular inoculated and not subcutaneous inoculated.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>), rainbow trout.

### 3. INTRODUCCIÓN

La salmonicultura se ha consolidado como una actividad de gran importancia económica en Chile, siendo actualmente el 2º productor mundial de salmón y 1º de trucha arcoiris de cultivo (SalmónChile 2005). El salmón chileno es el tercer producto exportado, tras el cobre y el concentrado de molibdeno. Durante el año 2006 los envíos al exterior sumaron US\$ 2.207 millones, con un aumento del 28,9% en comparación con el año 2005. Durante el primer trimestre del año 2007 las exportaciones aumentaron un 19 %, comparado con igual período del 2006 y los retornos acumularon una cifra superior a 713 millones de dólares FOB Chile. Los principales mercados para la salmonicultura nacional son actualmente Estados Unidos, Japón y la Unión Europea, registrando un alza importante América Latina y los países emergentes en el consumo de salmón como Rusia (SalmónChile 2007).

Sin embargo, a pesar de que la salmonicultura es una gran industria, siendo muy variadas las especies que se cultivan y que la producción en el mundo entero aumenta cada año; este aumento afecta en forma adversa la salud de los peces, incrementando la susceptibilidad a distintas infecciones (Olabuenaga 2000).

Las bacterias patógenas son causantes de graves enfermedades que pueden causar la muerte, tanto en peces de cautiverio como de vida libre. Entre estas bacterias las más comunes son los bacilos gram negativos de la familia *Flavobacteriaceae* (Crump y col 2005), género *Flavobacterium* incluyendo *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium branchiophilum*, *Flavobacterium aquatile*, *Flavobacterium johnsoniae* (Austin y Stobie 1991, Ostland y col 1997). A éste género pertenece también *Flavobacterium psychrophilum* (Bernardet y col 1996), antes llamada *Flexibacter psychrophila* y *Cytophaga psychrophila* (Pacha 1968), la cual es un importante patógeno de peces de agua dulce, ampliamente diseminado en cultivos de salmonídeos a través del mundo (Bernardet y Kerouault 1989).

*F. psychrophilum* se encuentra en la categoría de patógenos oportunistas que bajo condiciones ambientales adversas logra sobrepasar las barreras naturales representada mayoritariamente por la inmunidad innata del pez (Crump y col 2001). Origina diversas patologías en salmonídeos, desde necrosis ulcerativa de la piel hasta infección sistémica afectando los principales órganos del cuerpo. Según su forma de presentación el cuadro clínico recibe diferentes denominaciones: Enfermedad del pedúnculo, Enfermedad del agua fría (CWD), Enfermedad bacteriana del agua fría (BCWD), Síndrome de mortalidad de alevines (FMS), Mixobacteriosis visceral, Flavobacteriosis visceral y Síndrome del alevín de la trucha arcoiris (RTFS) (Holt y col 1993, Nematollahi y col 2003). Además, recientemente *F. psychrophilum* ha sido reconocida como agente etiológico de la Miositis necrotizante y Osteocondritis cefálica, variaciones de la CWD que afectan a truchas arcoiris en Ontario, Canadá (Lumsden y col 1996, Ostland y col 1997).

Ha mediados de los años ochenta *F. psychrophilum* fue aislada por primera vez fuera de Norteamérica; en Europa durante un brote de la enfermedad en truchas arcoiris (Lorenzen y col 1997, Bernardet y Kerouault 1989). Actualmente *F. psychrophilum* tiene una distribución mundial, reportándose brotes en Japón (Kondo y col 2002), Australia (Schmidtke y Carson 1995) y Chile (Bustos y col 1995).

*F. psychrophilum* es un bacilo gram negativo, delgado de bordes redondeados mide aproximadamente 1,5 – 7,5  $\mu\text{m}$  de largo por 0,2 – 0,75  $\mu\text{m}$  de diámetro (Pacha 1968, Bernardet y Kerouault 1989, Lorenzen y col 1997) y presenta movimiento deslizante difícil de observar (Bernardet y Kerouault 1989).

Para su cultivo se utilizan medios con bajo contenido nutritivo, como Anacker y Ordal o medio Cytophaga que puede ser modificado (MAO) para lo cual se aumenta el contenido de triptona (0,5 %) (Bernardet y Kerouault 1989). También se obtienen buenos resultados con medios que incorporan triptona y extractos de sales como el agar TYES con adición de leche y ramnosa (Daskalov y col 1999). Todos estos medios se pueden usar tanto en forma sólida como líquida (Inglis y col 1993).

*F. psychrophilum* es aerobio estricto (Bernardet y Kerouault 1989), la temperatura de incubación presenta rangos entre 5 - 25 °C con un crecimiento óptimo a los 15 °C (Holt y col 1993). Después de incubar por 48 a 96 horas (Pacha 1968), se observan colonias circulares convexas con un diámetro de 1 - 5 mm amarillas, brillantes, con borde irregular y también han sido observadas con borde regular, las colonias pueden estar solas o agrupadas (Bernardet y Kerouault 1989).

Bioquímicamente se caracteriza por poseer el pigmento flexirrubina, es además citocromo oxidasa y catalasa positivo y no posee habilidad para absorber Rojo Congo (Bernardet y Kerouault 1989, Lorenzen y col 1997). La bacteria carece de la habilidad para degradar carbohidratos simples o complejos pero es lipolítica y altamente proteolítica degradando albúmina, caseína, colágeno, fibrinógeno, gelatina, hemoglobina y tirosina (Bernardet y Kerouault 1989, Madsen y Dalsgaard 2000). La capacidad de degradar elastina es una característica variable entre aislados de *F. psychrophilum* (Madsen y Dalsgaard 2000).

*F. psychrophilum* carece de huésped específico ya que ha sido aislada desde distintas especies no salmonídeas como: anguila (*Anguilla anguilla*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), carpa común (*Cyprinus carpio*), pez dorado (*Carassius carassius*) y tenca (*Tinca tinca*) (Lehmann y col 1991). Probablemente afecta todas las especies de salmónidos, sin embargo, trucha arcoiris (*O. mykiss*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*O. kisutch*) son particularmente susceptibles (LaFrentz y col 2002).

La bacteria afecta alevines de trucha arcoiris, así como también truchas de mayor tamaño (Madetoja y col 2006). Durante brotes de la enfermedad se ha reportado que las mortalidades pueden superar el 80 % en alevines entre 0,2 y 2,5 g los cuales son más susceptibles; en peces de mayor tamaño puede llegar a un 20 % (Madsen y Dalsgaard 1999).



A pesar de la importancia de este patógeno en el cultivo de especies salmonídeas, la patogenia de la enfermedad no está bien dilucidada aún, principalmente en lo referente a las vías de transmisión y rutas de entrada del patógeno al organismo del pez (Nematollahi y col 2003).

Diversos estudios postulan que *F. psychrophilum* ingresaría a peces inmunodeprimidos vía branquial, a través de la piel o vía oral (Dalsgaard 1993). Aparentemente lesiones cutáneas o degradación de aletas podrían ser una vía de entrada de *F. psychrophilum* a los peces afectados, al interferir con los mecanismos de defensa inespecíficos allí existentes; permitiendo el ataque, colonización e invasión por parte de la bacteria hacia órganos internos. Por lo tanto, la piel como el mucus cutáneo del pez, desempeñarían un importante mecanismo de defensa contra *F. psychrophilum* (Lumsden y col 1996). Así parásitos en la piel, infecciones, vacunaciones, altos niveles de amonio, baños prolongados con formalina y manejos a los cuales son sometidos los peces, como graduaciones o transporte, pueden dañar la piel, alterando los mecanismos no específicos del sistema inmune, favoreciendo la invasión por parte de *F. psychrophilum*, originando enfermedad y mortalidad. (Madsen y Dalsgaard 1999, Madetoja y col 2000).

Los factores de virulencia de *F. psychrophilum* incluyen adhesinas, exotoxinas, proteasas, endotoxinas que contribuyen con la patogenicidad de la bacteria (Dalsgaard 1993).

La actividad proteolítica de la bacteria, a través de la acción de enzimas metaloproteasas calcio-dependientes, que causarían daño directo sobre los tejidos o que favorecerían la invasión de la bacteria, sería un importante factor de virulencia de *F. psychrophilum*, teniendo un rol importante en su patogenicidad (Pacha 1968, Madsen y Dalsgaard 1998, Secades y col 2001, Martínez y col 2004).

Factores ambientales, principalmente la temperatura del agua son cruciales en la expresión de la patogenicidad de *F. psychrophilum* (Dalsgaard 1993). La enfermedad es más prevalente en invierno y primavera cuando la temperatura del agua es menor a 10 °C (Austin y Austin 1999). Las mayores mortalidades ocurren a temperaturas bajas del agua (3 - 15 °C), disminuyendo estas al incrementarse la temperatura, no observándose mortalidades a temperaturas del agua sobre 23 °C (Dalsgaard 1993, Lumsden y col 1996).

Por otra parte, el nombre *psychrophilum*, proviene de las palabras griegas *psychros* y *filco* que significan frío y aficionado respectivamente (Riofrio 2003).

Las manifestaciones clínicas, la severidad de la enfermedad y los porcentajes de mortalidad dependen del estado de desarrollo de los salmonídeos, la temperatura y calidad del agua en que estos se encuentran; afectándose principalmente juveniles (Holt y col 1993).

Clínicamente los peces evidencian desorientación, letargia, anorexia, natación superficial, oscurecimiento de la piel (del Cerro y col 2002), exoftalmia bilateral, abultamiento abdominal (Lumsden y col 1996), degradación de aletas (Ostland y col 2000). El signo más evidente es la anemia revelada en la marcada palidez branquial (Rangdale 1999, Decostere y

col 2001). Ocasionalmente en la piel pueden observarse lesiones epidérmicas amarillentas, incluso con compromiso muscular cuando la enfermedad tiende a la cronicidad (Lumsden y col 1996). Internamente, marcada esplenomegalia (Rangdale 1999, Decostere y col 2001), hígado y riñón aumentados de tamaño y extremadamente pálidos. En riñón atrofia de su parte anterior y su parte excretora levemente grisácea. El intestino se observa sin alimento, delgado y decolorado, excepto en su parte caudal, la cual está frecuentemente inflamada y de color rojizo. También se describen dilatación gástrica, gastroenteritis, petequias en ciegos pilóricos y tejido adiposo visceral y ascitis (Austin y Stobie 1991).

Aunque *F. psychrophilum* se encuentra frecuentemente en cultivos de salmonídeos, el mecanismo de transmisión desde peces infectados a peces susceptibles todavía no a sido completamente comprendido (Madetoja y col 2000). Según Madsen y Dalsgaard (1999) *F. psychrophilum* es transmitida horizontalmente a través del agua y por contacto. El hábitat exacto de la bacteria es desconocido, suponiendo que sería la superficie de los peces o aguas con alto contenido de materia orgánica, considerándose una bacteria ubicuitaria (Holt y col 1993). Ha sido encontrada en mucus de piel, tejido conectivo de aletas, branquias, y opérculo de peces salmonídeos (Nematollahi y col 2003), sugiriendo que forma parte de la flora aeróbica de piel y branquias de peces salmonídeos (Madetoja y col 2002).

*F. psychrophilum* ha sido aislada además desde fluido ovárico y gametos de reproductores de trucha sin signos evidentes de la enfermedad, indicando que estos actúan como portadores y reservorios de la enfermedad (Ekman y col 1999, Madsen y col 2005). Brown y col (1997), recuperaron *F. psychrophilum* desde el interior de ovas recientemente fertilizadas, así como desde ovas con ojo y alevines recientemente eclosionados; siendo el primer reporte de aislamiento de *F. psychrophilum* desde el interior de ovas salmonídeas desinfectadas en su superficie, demostrando que la bacteria puede ser transmitida verticalmente. Sin embargo, esto no pudo ser confirmado en publicaciones posteriores (Madsen y col 2005).

Tomando en consideración lo anterior, *F. psychrophilum* ingresaría al hospedador por una combinación de rutas de entrada (Nematollahi y col 2003). De esta manera existiría la transmisión horizontal y vertical de *F. psychrophilum*. Además es importante considerar su presencia en el agua y la posibilidad que insectos, anfibios y otros animales puedan actuar como reservorios (Brown y col 1997).

El diagnóstico se realiza en asociación con la signología clínica, aislamiento del agente desde riñón, bazo o incluso cerebro de peces afectados. Adicionalmente se utilizan test de aglutinación con suero anti-*F. psychrophilum* (Ekman 2003), PCR (Wiklund y col 2000), IFAT (Madetoja y col 2000), ELISA (Madetoja y col 2006) e inmunohistoquímica (Evensen y Lorenzen 1996).

Diagnóstico diferencial puede incluir Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), Enfermedad bacteriana del riñón (*Renibacterium salmoninarum*), y lesiones causadas por *Aeromonas hydrophila* (Lumsden y col 1996).

Es fundamental la prevención de los brotes de la enfermedad. Un tratamiento profiláctico efectivo, consiste en crear condiciones medioambientales óptimas; evitando sobrepoblación, minimizando situaciones de estrés, optimizando la calidad del agua, higiene y manejo en general durante todo el proceso productivo (Ekman 2003).

Frente a brotes de la enfermedad los peces son tratados sucesivamente con antibióticos; siendo esto desfavorable debido a los altos costos, además del daño potencial e impacto en la salud humana y medio ambiente (Crump y col 2001). Los más comúnmente usados son oxitetraciclina, florfenicol y amoxicilina (Holt y col 1993).

En Chile, en un estudio de sensibilidad a antibióticos más usados en el tratamiento de *F. psychrophilum* realizado durante los años 2000 a 2002 en aislados de la décima región, la bacteria presentó frente a florfenicol y oxitetraciclina las mayores sensibilidades con un 79,8 y 79,5 % respectivamente. Frente a enrofloxacino y flumequina la bacteria evidenció menor porcentaje de sensibilidad (69,2 y 63 %), en tanto, frente a los antibióticos amoxicilina y ácido oxolínico mostró las sensibilidades más bajas con sólo un 58,9 y 51,7 % respectivamente (Riofrío 2003).

El primer aislamiento publicado en Chile se efectuó en el año 1993. Esto tras observar altas mortalidades en lotes de truchas arcoiris (*O. mykiss*) en crianza de agua dulce, tanto en ríos como en lagos. Probablemente la enfermedad ingresó a Chile a través de ovas contaminadas provenientes de Europa, al presentarse los brotes principalmente en truchas importadas, sin embargo, es difícil determinarlo decisivamente. Desde entonces ha mostrado ser una enfermedad muy insidiosa y de difícil control terapéutico (Bustos y col 1995).

En Europa, Estados Unidos y Chile, la CWD y RTFS continúan originando pérdidas en la salmonicultura en fase de agua dulce, dependiendo principalmente del desarrollo de los salmonídeos afectados, describiéndose mortalidades entre 5 y 70 % (Riofrío 2003).

En el sur de Chile la tendencia de presentación de la enfermedad según estación del año muestra que el mayor porcentaje se presenta en primavera seguido por las estaciones de invierno, verano y un valor muy bajo en otoño (Riofrío 2003).

A pesar del evidente y creciente problema que presenta *F. psychrophilum*, no existe una vacuna efectiva (del Cerro y col 2002). Ciertos estudios de desarrollo de vacunas, han resultado ser parcialmente exitosos en reducir tasas de mortalidad en grupos de peces, sin embargo, no han sido evaluadas a gran escala (Rahman y col 2002, Nematollahi y col 2003).

Recientemente en Finlandia, Madetoja y col (2006), publicó el primer estudio realizado bajo condiciones de campo, la vacuna probada presentó una excelente eficacia, produciendo altos niveles de anticuerpos y protección frente a infecciones por *F. psychrophilum* en truchas arcoiris de 12 g.

Sin embargo, debido a que los brotes de la enfermedad se presentan principalmente en las fases tempranas del ciclo productivo, en las cuales se presenta un incipiente desarrollo del

sistema inmune (Cipriano y Holt 2005), el resultado de la administración de vacunas puede ser poco efectivo. Es por esto que es necesario disminuir la posibilidad de infección frente a *F. psychrophilum* en truchas juveniles por ejemplo mediante la administración de agentes inmunoestimulantes como prevención.

En lo que respecta a la reproducción de la enfermedad en forma experimental, se han publicado resultados muy discrepantes mediante diferentes técnicas tales como: baños de inmersión con el patógeno e infección oral o anal (Nematollahi y col 2003). Hasta el momento los métodos más efectivos han sido la inyección subcutánea, intraperitoneal e intramuscular, pero aún así, en estos estudios el porcentaje de mortalidad ha sido altamente dependiente de la virulencia de la cepa utilizada, obteniéndose entre un 0 y un 100 % de mortalidad (Madsen y Dalsgaard 1999). Con el objetivo de imitar una ruta de infección natural, diversos estudios han tenido éxito utilizando un modelo de infección experimental por cohabitación entre peces infectados y sanos, pero sólo sometiendo a los peces a situaciones estresantes (Madsen y Dalsgaard 1999, García y col 2000).

Para la determinación de la potencia de una vacuna existen métodos mediante los cuales se evalúa su eficacia y uno de éstos es el aumento de la DL<sub>50</sub> (Cristi 2003, Navarrete 2004). El término DL<sub>50</sub> es el más representativo de la toxicidad de una sustancia y se define como aquella dosis del compuesto que produce la muerte del 50 % de los animales. Es señalada como una determinación simple, pero imperfecta de toxicidad de una sustancia; imperfecta desde el punto de vista de la toxicidad, ya que existe un amplio margen de efectos patológicos entre la ausencia de efecto y la letalidad. Sin embargo, es un valor útil, puesto que es imprescindible para el estudio de la toxicidad a largo plazo (Jurado 1989).

Si bien el Método de Reed y Muench para el cálculo de DL<sub>50</sub> es bastante antiguo, aun es bastante utilizado (Michel y García 2003), adicionalmente es un método que se aplica en el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática de la Universidad Austral de Chile, perteneciente al Instituto de Patología Animal (Treuquemil 2005, Jiménez 2006).

La hipótesis del estudio es que trucha arcoiris (*O. mykiss*) inoculadas experimentalmente con una cepa de *F. psychrophilum* aislada desde trucha arcoiris (*O. mykiss*) en Chile desarrollan Flavobacteriosis permitiendo establecer una dosis letal 50.

En consecuencia el objetivo del estudio es reproducir la Flavobacteriosis en trucha arcoiris (*O. mykiss*), de 15 - 40 g mediante la inoculación experimental vía intramuscular y subcutánea de una cepa nacional de *F. psychrophilum*, reaislar la bacteria desde los peces moribundos, realizar su identificación microscópica, bioquímica y serológica y determinar la mortalidad asociada para calcular la DL<sub>50</sub>.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Material biológico

Para la realización de este experimento se utilizaron 374 alevines de trucha arcoiris (*O. mykiss*), con un rango de 15 - 40 g, los cuales se obtuvieron de una piscicultura de la novena región desde un lote sin antecedentes de Flavobacteriosis. Fueron transportados en bidones plásticos de 200 litros con oxigenación constante a la Sala de Estanques del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática, perteneciente al Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile.

Para la inoculación experimental se utilizó la cepa 46-05 identificada y clasificada como *F. psychrophilum*, la cual se encuentra actualmente en el laboratorio. Esta cepa fue previamente aislada de un caso clínico de Flavobacteriosis diagnosticado en truchas arcoiris (*O. mykiss*) durante el año 2005.

#### 4.1.2. Material de sala de acuarios.

Se utilizaron 10 acuarios de fibra de vidrio con capacidad para 80 litros, equipados con sus correspondientes filtros de agua con carbón activado, bombas, difusores de aire y termómetros. Esto conectado a un sistema de emergencia eléctrico.

#### 4.1.3. Material de laboratorio.

Material de disección, mecheros, asas de cultivo, placas Petri, agar TYES, portaobjetos, bandejas de disección, tinción de gram, toalla de papel absorbente, guantes desechables, solución anestésica BZ-20® (etil p-aminobenzoato)<sup>1</sup>, alcohol de 95%.

### 4.2. MÉTODO

#### 4.2.1. Recepción de los peces y chequeo sanitario

Previo a la inoculación experimental los alevines fueron mantenidos en un estanque circular de 1000 litros equipado con un filtro de perlón y carbón activado, en aireación constante durante una semana para su aclimatación. Durante este período se efectuó un chequeo sanitario, de acuerdo a los procedimientos del Manual de Diagnóstico de Enfermedades de los Animales Acuáticos de la Organización Internacional de Epizootias (OIE 2006), para lo cual se tomó una muestra al azar de 30 alevines, con el propósito de descartar la presencia de agentes infectocontagiosos que pudiesen interferir con los resultados del experimento. Los peces se sacrificaron mediante sobredosis de anestesia, luego se realizó examen externo y necropsia. Se sembraron muestras de riñón de cada pez en agar TSA (agar soya tripticasa), incubando a 20 - 22 °C por 5 días y en agar TYES incubado a 18 °C.

---

<sup>1</sup> BZ-20® Veterquímica Camino a Melipilla 5641, Los Cerrillos, Santiago Chile.

Además se tomaron muestras de riñón y bazo para tinción de Gram. Para el examen virológico se realizaron “pooles” de riñón y bazo, inoculándose en la línea CHSE-214 a 15 °C, realizando tres pasajes de siete días cada uno.

#### 4.2.2. Preparación del inóculo

La cepa de *F. psychrophilum* fue descongelada y cultivada en caldo TYES. Al cabo de 3 días al observarse turbidez en el tubo, se procedió a realizar una siembra en placas de agar TYES. Transcurridas 96 horas fueron visibles las colonias características de *F. psychrophilum* y se determinó su pureza mediante microscopía óptica realizando una suspensión de la bacteria en PBS sobre un portaobjetos para tinción de Gram.

Con el objetivo de reactivar la bacteria y comprobar su patogenicidad se preparó una suspensión de la bacteria en PBS medida a una apreciación visual, utilizando el estándar de turbidez de Mc Farland (5 Mc Farland), con la cual fueron inoculados con 0,1 ml 11 peces vía intramuscular. Este procedimiento fue realizado 4 veces y en todos ellos se presentó mortalidad asociada.

Se reaisló la bacteria desde riñón de los peces moribundos y se cultivó en placas de agar TYES incubadas a 18 °C durante 96 horas.

Para la inoculación experimental, basándose en datos obtenidos en recuentos en placa para antibiograma, se preparó una suspensión de la bacteria en PBS a una densidad óptica (D.O<sub>600 nm</sub>) de 0,21 medida por espectrofotometría que determinó una concentración de  $1,1 \times 10^7$  ufc/ml por recuento en placa. A partir de ésta concentración se realizaron 4 diluciones en base 10, con las cuales se inocularon los distintos grupos experimentales.

### 4.3. Diseño experimental

Se trasladaron 300 alevines a la Sala de Inoculación Experimental, donde en 10 acuarios de 80 litros con agua dulce, equipados con aireación constante y filtros de carbón activado que permiten la retención de partículas sólidas y amonio, fueron ubicados 30 alevines al azar conformando 5 grupos experimentales en duplicado.

Previo ayuno de 24 horas, todos los peces fueron desafiados el día 0, mediante inoculación intramuscular o subcutánea con 0,1 ml de una suspensión bacteriana de *F. psychrophilum* en concentraciones decrecientes. Los peces de los grupos control se inocularon con 0,1 ml de PBS.

El procedimiento de inoculación fue efectuado previa anestesia de los peces mediante inmersión en un balde con el producto BZ-20 en dosis de 50 mg/L por 2-4 minutos, en aireación constante. La inoculación por la vía intramuscular se efectuó en la musculatura dorsal izquierda en un punto equidistante entre la aleta dorsal y línea lateral del pez formando un ángulo de 90° (Figura 1). Para la vía subcutánea el lugar de inoculación fue en la base del

extremo craneal de la aleta dorsal formando un ángulo de aproximadamente 30° en relación a la superficie lateral del pez (Figura 2).



**Figura 1.** Lugar de inoculación vía intramuscular con una cepa de *F. psychrophilum* en trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 – 40 gramos.



**Figura 2.** Lugar de inoculación vía subcutánea con una cepa de *F. psychrophilum* en trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 – 40 gramos.

De esta forma, de los 30 peces se inocularon 15 de ellos vía intramuscular y los 15 restantes vía subcutánea, de tal manera que fueron ubicados en el mismo acuario. Para diferenciar visiblemente ambas vías se realizó un pequeño corte en la aleta adiposa de aquellos

peces inoculados vía subcutánea. La duración del experimento fue de 30 días. Lo anterior se señala en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Grupos experimentales de 30 alevines de trucha arcoiris (*O. mykiss*), de 15 - 40 g, inoculados vía intramuscular y subcutánea con una cepa nacional de *F. psychrophilum* en diferentes concentraciones a un promedio de temperatura de 10,7 °C.

| Grupo Experimental | Acuarios (N°) | N° de peces vía im | N° de peces vía sc | Concentración ufc/ml | Concentración del inóculo |
|--------------------|---------------|--------------------|--------------------|----------------------|---------------------------|
| 1                  | 1             | 15                 | 15                 | 10 <sup>8</sup>      | 10 <sup>7</sup> ufc/pez   |
|                    | 2             | 15                 | 15                 | 10 <sup>8</sup>      | 10 <sup>7</sup> ufc/pez   |
| 2                  | 3             | 15                 | 15                 | 10 <sup>7</sup>      | 10 <sup>6</sup> ufc/pez   |
|                    | 4             | 15                 | 15                 | 10 <sup>7</sup>      | 10 <sup>6</sup> ufc/pez   |
| 3                  | 5             | 15                 | 15                 | 10 <sup>6</sup>      | 10 <sup>5</sup> ufc/pez   |
|                    | 6             | 15                 | 15                 | 10 <sup>6</sup>      | 10 <sup>5</sup> ufc/pez   |
| 4                  | 7             | 15                 | 15                 | 10 <sup>5</sup>      | 10 <sup>4</sup> ufc/pez   |
|                    | 8             | 15                 | 15                 | 10 <sup>5</sup>      | 10 <sup>4</sup> ufc/pez   |
| 5                  | 9             | 15                 | 15                 | PBS                  | PBS                       |
|                    | 10            | 15                 | 15                 | PBS                  | PBS                       |

#### 4.4. Confirmación de la mortalidad por *F. psychrophilum*

Los peces que se presentaron moribundos y/o muertos fueron sometidos a los siguientes análisis:

1. Examen clínico externo y necropsia.
2. Frotis e improntas de riñón y bazo para tinción de Gram.
3. Reaislamiento en agar TYES.
4. Identificación del agente mediante sistema API ZYM®.
5. Aglutinación rápida en placa.
6. Realización de PCR.

Para la realización de examen externo se consideraron principalmente, el estado de la piel (coloración y lesiones), aletas, ojos, branquias y opérculo. El examen interno se realizó siguiendo la técnica de necropsia de la American Fisheries Society (1992), que consiste brevemente en: el corte de la aleta pectoral izquierda por la base mediante el uso de tijeras, introduciendo la punta en la base de la aleta y realizando un corte dorso - ventral hasta la línea media ventral siguiendo el curso de ésta hasta poco antes del poro anal. Luego un corte dorso -



<sup>1</sup> craneal siguiendo la línea lateral y posteriormente un corte dorso - ventral por detrás del opérculo, desprendiendo la pared abdominal ventro - lateral izquierda, realizando la observación de los órganos internos, teniendo en cuenta rasgos tales como: color y consistencia, presencia de hemorragias, inflamación, pústulas, nódulos y la presencia o ausencia de alimento o mucus en estómago e intestino.

Para reaislar la bacteria se tomó 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 TYES, incubado a una temperatura de 18 °C por 96 horas. Las colonias que presentaron características morfológicas con *F. psychrophilum* fueron tomadas y analizadas con los métodos diagnósticos que se describen a continuación; con el propósito de confirmar el reaislamiento de la bacteria.

De todos los peces moribundos, muertos y sobrevivientes al desafío, se realizaron improntas de bazo y riñón para posteriormente realizar tinción de Gram.

El método API ZYM®<sup>2</sup> para la determinación rápida de algunas reacciones enzimáticas bacterianas, se realizó con una suspensión de colonias de *F. psychrophilum* que fueron colocadas en los pocillos del sistema API ZYM®, se incubó por 24 a 48 horas a 18 °C después de lo cual fueron agregados los reactivos correspondientes. Los resultados se interpretaron de acuerdo a una tabla colorimétrica proporcionada por el fabricante.

La aglutinación rápida en placa consistió en hacer reaccionar una suspensión de la bacteria en PBS con un antisero específico para *F. psychrophilum*.

Las cepas de *F. psychrophilum* fueron verificadas mediante la técnica de PCR en el Laboratorio de Biotecnología Acuática.

Cumplidos los 30 días de desafío experimental, los peces sobrevivientes de los 10 acuarios fueron sacrificados con una sobredosis del producto anestésico y posteriormente sometidos a los procedimientos de diagnóstico previamente descritos.

Todos los residuos de peces, materiales de laboratorio utilizados en la inoculación y cultivos bacterianos, fueron debidamente esterilizados en autoclave, para evitar la diseminación del agente infeccioso. Así como también, las tinciones y alcoholes utilizados fueron vertidos en bidones plásticos debidamente rotulados, para su posterior eliminación de acuerdo a las normas de bioseguridad de la Universidad Austral de Chile.

---

<sup>2</sup> API ZYM Kit comercial Laboratorio Biomérieux.

#### 4.5. Método de cálculo para la DL<sub>50</sub>

Para la realización del cálculo de la DL<sub>50</sub> se utilizó la fórmula de Reed y Muench.

DL<sub>50</sub> = (log dilución con más del 50 % mortalidad) + (distancia proporcional x log dilución)

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

Factor de dilución = 10

Logaritmo (log) dilución = 1

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Mortalidad

Durante los 30 días del experimento no se observó mortalidad en ninguno de los grupos de peces inoculados vía subcutánea (sc); como tampoco en los grupos control.

En cuanto a la vía intramuscular, el cuadro 2 muestra el porcentaje total de mortalidades por grupo de los peces inoculados por esta vía.

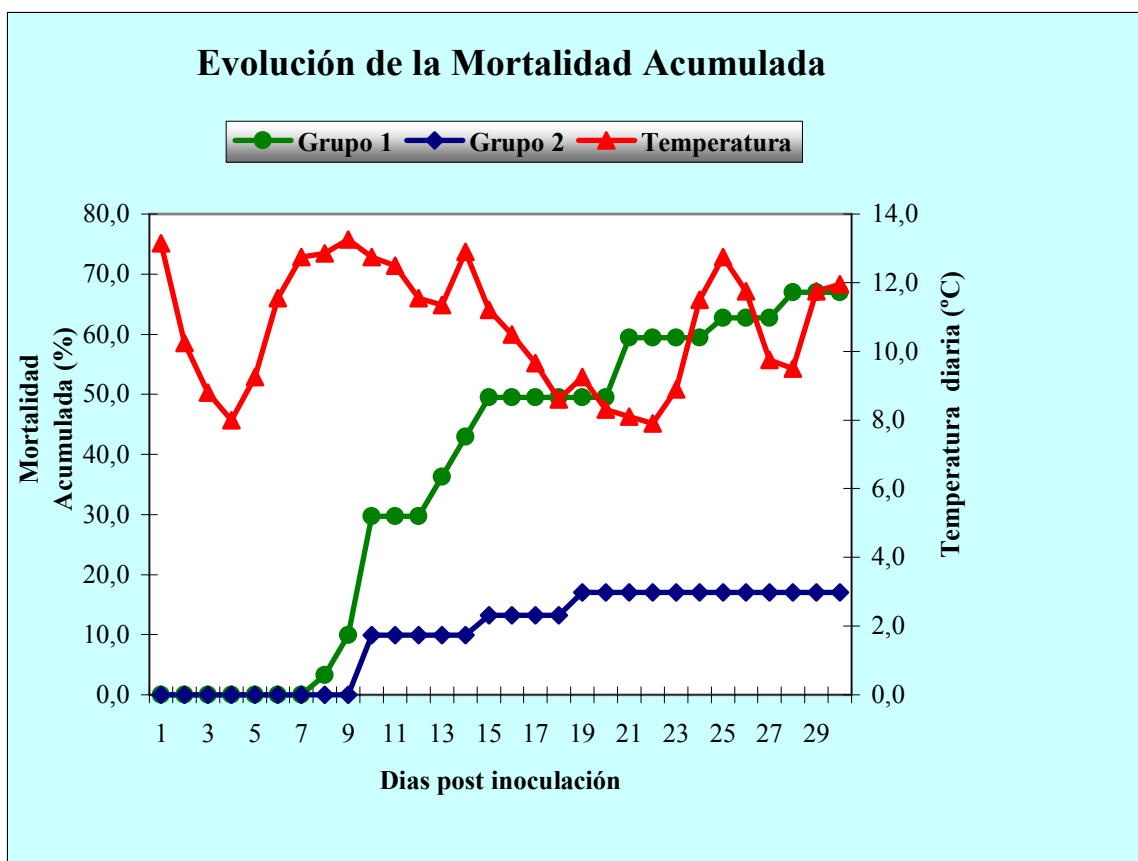
**Cuadro 2.** Mortalidad total y porcentaje de truchas arcoiris (*O. mykiss*) de 15 a 40 g asociada a *F. psychrophilum* según concentración bacteriana del inóculo, a un promedio de temperatura de 10,7 °C.

| Grupos | Acuario N° | Concentración bacteriana ufc/0.1 ml | N° de peces inoculados | Mortalidad total por grupos | Mortalidad % |
|--------|------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------|
| 1      | 1+2        | 10 <sup>7</sup>                     | 30                     | 20                          | 66,6%        |
| 2      | 3+4        | 10 <sup>6</sup>                     | 30                     | 5                           | 16,6%        |
| 3      | 5+6        | 10 <sup>5</sup>                     | 30                     | 1                           | 3.3%         |
| 4      | 7+8        | 10 <sup>4</sup>                     | 30                     | 0                           | 0%           |
| 5      | 9+10       | PBS                                 | 30                     | 0                           | 0%           |

En los peces del grupo 1, correspondientes a los acuarios 1 y 2 inoculados con 10<sup>7</sup> ufc/ml, las mortalidades se presentaron a partir del día 8 hasta el día 28 post-inoculación (pi). El día 10 pi se observó el mayor número de peces muertos (6/19,8 %). El número total de peces muertos en éste grupo fue de 20, correspondiendo a un total de 66,6 % de mortalidad acumulada. Sobrevivieron este desafío 10 peces.

Los peces del grupo 2, correspondientes a los acuarios 3 y 4 (10<sup>6</sup> ufc/0,1 ml), las mortalidades se presentaron entre los días 10 y 19 pi. La mortalidad acumulada fue de un 16,6 % y correspondió a 6 peces. 24 peces sobrevivieron el desafío.

La figura 3 señala la evolución de la mortalidad diaria acumulada en porcentaje indicando la relación con la temperatura del agua.



**Figura 3.** Evolución de la mortalidad diaria acumulada en trucha arcoiris (*O. mykiss*), de 15 - 40 g inoculadas vía intramuscular con una cepa nacional de *F. psychrophilum*.

En el grupo 3, acuarios 5 y 6 ( $10^5$  ufc/0,1 ml), el día 21 post inoculación se presentó un pez muerto el cual correspondió a un 3,3 % de mortalidad acumulada. 29 peces sobrevivieron al desafío.

En el grupo 4, correspondiente a los acuarios 7 y 8 ( $10^4$  ufc/0,1 ml) no se registraron signos clínicos de Flavobacteriosis, como tampoco mortalidades.

## 5.2. Signos clínicos

La signología clínica observada en los peces inoculados vía im evidentemente enfermos mientras aún permanecían en los acuarios fue principalmente: desorientación, letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia bilateral, alteraciones en la conducta natatoria, y en casos avanzados los peces permanecieron inmóviles incluso al agitarse la superficie del agua.

Al realizar examen externo de los peces encontrados moribundos o muertos se evidenció una marcada palidez branquial, exoftalmia bilateral, degradación de la aleta caudal, aumento de volumen en el lugar de inoculación, en casos mas avanzados la formación de una ampolla en el mismo e incluso lesiones cutáneo-musculares las cuales eran cavernosas y con una coloración amarillenta en la periferia, pudiendo observarse incluso las vértebras en algunos casos.



**Figura 4.** Trucha arcoiris (*O. mykiss*) exhibiendo una lesión externa producida en el lugar de inoculación vía im de 0,1 ml de una suspensión de *F. psychrophilum*.

También en algunos casos se observó abultamiento abdominal, hemorragias en la base de las aletas y ano.

La signología observada al realizar el examen interno fue la siguiente: marcada esplenomegalia, hígado y riñón aumentados de tamaño y extremadamente pálidos; en riñón se observó además atrofia de su parte anterior y su parte excretora levemente grisácea, el intestino se observó sin alimento, delgado y decolorado, excepto en su parte caudal la cual estaba frecuentemente inflamada. El peritoneo y el tejido circundante frecuentemente se encontraron hemorrágicos, en otros casos se evidenció una marcada hemorragia abdominal.

### 5.3. Diagnóstico

De todos aquellos peces muertos y moribundos inoculados vía intramuscular se realsió la bacteria a partir de riñón, sembrándola en agar TYES. Posteriormente se incubó durante 96 horas; transcurrido este tiempo, se obtuvo colonias circulares, convexas, de color amarillo brillante, con un diámetro aproximado de 1 - 5 mm y borde irregular. Además resultaron también positivos dos peces del grupo 1 inoculados vía im ( $10^7$  ufc/ml) que sobrevivieron al desafío.

Se realizó además improntas de riñón y bazo para tinción de Gram, dando como resultado a microscopia óptica la presencia de bacilos Gram negativo, delgados de bordes redondeados.

También se realizó diagnóstico mediante técnica de PCR, sistema API ZYM® y aglutinación en placa a las colonias morfológicamente pertenecientes a *F. psychrophilum*, las cuales fueron positivas.

De todos los peces sobrevivientes al desafío tanto inoculados vía sc como im incluidos los grupos control, se realizaron pruebas diagnósticas resultando negativas todas ellas, exceptuando los dos peces previamente señalados.

#### 5.4. Determinación de la DL<sub>50</sub>

$$\text{Distancia proporcional (DP)} = \frac{66,6 \% - 50 \%}{66,6 \% - 16,6 \%} = 0,33$$

$$DL_{50} = 7 + (0,33 \times 1) = 7,33$$

$$DL_{50} = 10^{7,33} \text{ ufc/ml}$$

Por lo tanto, la DL<sub>50</sub> calculada para trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 a 40 gramos inoculados intramuscularmente con *F. psychrophilum* a una T° promedio de 10,7 °C fue de **10<sup>7,33</sup> ufc/ml.**

## 6. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue reproducir la Flavobacteriosis, lo que se realizó utilizando una cepa nacional de *F. psychrophilum* denominada 46-05 mantenida en el cepario del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática de la Universidad Austral de Chile y a su vez se determinó la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) para truchas arcoiris (*O. mykiss*) de 15 - 40 g. Para esto se realizó la inoculación experimental vía intramuscular (im) y subcutánea (sc), monitoreando el desarrollo de la enfermedad durante 30 días postinoculación (pi).

La cepa utilizada de *F. psychrophilum* fue elegida en base a los datos obtenidos en un estudio previo, donde fue caracterizada fenotípica y genéticamente por Aravena (2006). Previo a la inoculación experimental, se realizaron 4 pasajes *in vivo* de la bacteria en peces de la misma especie y peso, con el objetivo de recuperar su patogenicidad según lo descrito por Michel (1980), quien señala que cepas bacterianas almacenadas en laboratorio pierden sus propiedades patógenas. Los pasajes *in vivo* son considerados normalmente como una de las mejores vías para preservar la patogenicidad de las bacterias (Michel y García 2003).

Como control se utilizó una solución salina buffer fosfato (PBS) estéril al igual que para las diluciones de la bacteria, la cual no influye en la sobrevivencia de la bacteria; solución utilizada también por Rangdale (1999) y Ekman (2003).

La cantidad de 0,1 ml de inóculo bacteriano utilizada en ambas vías (im y sc) para inducir la enfermedad en truchas de 15 - 40 g, concuerda con lo realizado por Michel y García (2003) quienes inocularon 0,1 ml en peces de aproximadamente 11 g. Difiere con lo realizado por Madetoja y col (2002), quien inoculó 0,05 ml de suspensión bacteriana vía sc logrando reproducir la enfermedad, sin embargo, esos peces presentaban un peso de 9 g. Además, el volumen de 0,1 ml corresponde al usado en la inoculación de vacunas a los peces en producción intensiva.

La duración del estudio fue de 30 días, periodo que normalmente se utiliza en estudios de DL<sub>50</sub>, al igual que lo realizado en estudios de García y col (2000), Michel y García (2003), quienes utilizaron el mismo periodo para determinar la DL<sub>50</sub> de *F. psychrophilum* en truchas arcoiris (*O. mykiss*).

La temperatura del agua se verificó diariamente dos veces al día, siendo el promedio diario menor observado de 7,9 °C y el mayor 13,25 °C, con un promedio total durante los 30 días de experimentación de 10,7 °C, que se encuentra dentro del rango de presentación de la enfermedad según Lumsden y col (1996), que fluctúa entre los 3 y 15 °C. La temperatura del agua es uno de los factores fundamentales y determinantes para el desarrollo de la enfermedad dado que *F. psychrophilum* es una bacteria psicrotrofica (Crump y col 2005), que posee proteínas termolábiles involucradas directamente en la patogenia de la enfermedad. Las

mortalidades disminuyen al aumentar la temperatura sobre 15 °C y no se presentan en rangos de temperatura superiores a 23 °C (Dalsgaard 1993).

En los peces existen dos factores que influyen notoriamente en la respuesta inmune y la producción de anticuerpos: los cambios estacionales y la temperatura. Numerosos estudios han demostrado que las bajas temperaturas deprimen los mecanismos de defensa no específicos, tanto humoral como celular de los peces (Olabuenaga 2000). Por lo tanto, durante el desarrollo de este estudio se presentaron las condiciones ideales, en cuanto al promedio de temperatura (10,7°C), para la manifestación de la enfermedad.

La inoculación vía sc no presentó mortalidad asociada, por lo tanto, no fue posible determinar la dosis letal media por esta vía. Los peces de 15 - 40 g, que recibieron una dosis de  $1,1 \times 10^7$  ufc/pez no presentaron signología clínica, no hubo mortalidades y no fue posible aislar la bacteria desde órganos internos al finalizar el desafío.

La vía sc es una vía menos agresiva ya que no es inyectada directamente a nivel muscular. Por lo tanto, es posible que el sistema inmune de estos peces fue capaz de resistir la infección vía sc y que la concentración bacteriana requerida para reproducir la enfermedad en trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 a 40 g vía sc sea superior a  $1,1 \times 10^7$  ufc/pez; tomando en cuenta que Madetoja (2002) logró reproducir la enfermedad, en truchas de un peso menor (9 g), inoculando  $1,9$  a  $6,6 \times 10^7$  ufc/pez vía sc. En dicho estudio las mortalidades comenzaron a los 4 días pi y fueron más altas a los 5 y 7 días pi, hasta el final del experimento el cual fue de 28 días.

Durante el transcurso de este estudio se pudo confirmar que la cepa en estudio inoculada vía im tiene la capacidad de producir la enfermedad, ya que se evidenció signología clínica y mortalidad en los grupos inoculados con la dosis  $10^7$  ufc/pez,  $10^6$  ufc/pez y  $10^5$  ufc/pez. La mortalidad acumulada obtenida en este trabajo fue 66,6 % para la dilución de  $10^7$  ufc/pez, 16,6 % para la dilución de  $10^6$  ufc/pez y 3,3 % para  $10^5$  ufc/pez. Obteniendo mortalidades para tres de los grupos con las diluciones más altas, lo que confirma la capacidad de la cepa para producir la enfermedad en trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 - 40 gramos.

En relación a los peces inoculados vía im, durante los primeros 3 días pi no presentaron signología clínica. A partir del día 4 pi, el primer signo de anormalidad fue un cambio de comportamiento en algunos peces; el cual consistía en que estos se mantenían alejados de los demás y en la parte posterior del acuario sin alimentarse, presentando coloración oscura de la piel; sumado a esto la aparición de una ligera tumefacción unilateral en el punto de inyección manteniéndose intacta la epidermis. La lesión fue aumentando de tamaño y durante el sexto día se observó la pérdida de epidermis de una zona de aproximadamente 2 a 3 cm de diámetro. La lesión prosiguió con la formación de una ampolla, la cual protruía aproximadamente 1 cm de la pared lateral. A este nivel (día 8 pi) comenzaron las mortalidades. Los peces que sobrevivieron a esta primera etapa continuaron con el desarrollo de la lesión, rompiéndose la ampolla originando una lesión cavernosa en la musculatura con una coloración amarilla en la periferia. Este desarrollo de las lesiones en los peces inoculados vía im coincide con lo descrito por Lumsden y col (1996), quien inoculó truchas arcoiris (*O. mykiss*) im con aislados



de *F. psychrophilum* de truchas infectadas naturalmente y que presentaban estas lesiones en los flancos, denominándola miositis necrótica, debido al daño en la musculatura.

Lumsden y col (1996), postularon que la miositis necrótica presente en peces infectados en forma natural, comenzaría como una infección superficial, tal vez exacerbada por abrasiones debidas a la sobrepoblación. La bacteria penetraría la epidermis y dermis, proliferaría en músculo y se propagaría en forma sistémica.

La signología interna observada concuerda con otros estudios en que se reprodujo la enfermedad vía im en truchas arcoiris (*O. mykiss*) (Lumsden y col 1996, Madetoja 2002), siendo lo más notorio la marcada esplenomegalia, anemia, hígado y riñón aumentados de tamaño y extremadamente pálidos, parte anterior del intestino decolorado, sin alimento y la parte posterior inflamada. Esta signología clínica observada concuerda con lo descrito en salmón coho (*O. kisutch*) (Inglis y col 1993).

La enfermedad manifestó una tendencia a la cronicidad debido a que las mortalidades comenzaron a partir del día 8 pi, con lesiones típicas de un cuadro crónico según lo descrito por Lumsden y col (1996). Las mortalidades continuaron hasta el día 28 pi; presentándose incluso peces con evidentes lesiones musculares el día 30 pi, los cuales fueron sacrificados junto a los demás peces sobrevivientes al desafío.

Para el reislamiento del agente se utilizó agar TYES igualmente usado con buenos resultados en varios estudios similares (Ekman y col 1999, Madsen y col 2005), con adición de leche y ramnosa (Daskalov y col 1999) incubado a 18 °C durante 96 horas. Para la confirmación se realizó repiques en el mismo medio observándose la presencia de colonias circulares, amarillas, brillantes, convexas, de borde irregular (Inglis y col 1993) a las cuales se realizó tinción de Gram observándose a microscopia óptica bacilos Gram negativos, alargados y de bordes redondeados (Austin y Austin 1999).

Se obtuvo un 100 % de reislamiento de la bacteria de los peces moribundos y muertos a partir de muestras obtenidas desde riñón, en cultivo en agar TYES. Además, es importante destacar que se pudo reislar la bacteria desde riñón de 2 peces sobrevivientes a los 30 días de desafío, que presentaban lesiones musculares, estos fueron peces del grupo 1, pertenecientes a los acuarios 1 y 2 ( $10^7$  ufc/pez). Estos datos no fueron considerados para el cálculo de  $DL_{50}$  porque estos peces no murieron dentro de los 30 días del experimento.

De los demás peces sobrevivientes al desafío no fue posible reislar la bacteria desde riñón y bazo, igualmente coincidente con estudios de  $DL_{50}$  de García y col (2000) y Michel y García (2003), por lo que se puede deducir que el sistema inmune de estos peces fue capaz de resistir la infección vía im o sc por *F. psychrophilum*.

No se registró signología clínica como tampoco mortalidad en ambos grupos control, al igual que lo descrito en estudios realizados por Madetoja y col (2002) y Álvarez y col (2006) quienes también utilizaron PBS para la inoculación de estos grupos.

La utilización de improntas de riñón y bazo utilizado rutinariamente en todo laboratorio de diagnóstico, fue un método útil y de rápida confirmación de la presencia de la bacteria Gram negativa (Treuquemil 2005), de forma bacilar, la que correspondió morfológicamente con *F. psychrophilum*.

Los métodos de diagnóstico aglutinación en placa, PCR y sistema API ZYM® ampliamente utilizados en laboratorios y en estudios de *F. psychrophilum* (del Cerro y col 2002, Aravena 2006), si bien no fueron utilizados para cada pez analizado debido al gran número de muestras y al costo que esto implica, fueron de gran utilidad en etapas finales del experimento como confirmación de las demás pruebas antes realizadas.

La DL<sub>50</sub> 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 %, determinándose en 10<sup>7,33</sup> ufc/ml para trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 - 40 g inoculadas vía intramuscular.

Datos de otros estudios de dosis letal media en trucha arcoiris (*O. mykiss*) realizados por García y col (2000), quienes utilizaron peces de aproximadamente 5 g, inoculados vía im con 0,05 ml de una suspensión de *F. psychrophilum*, determinaron una DL<sub>50</sub> de 2,4 x 10<sup>5</sup> ufc/ml a una temperatura promedio de 11 °C.

Michel y García (2003) inyectando intramuscularmente una dilución bacteriana de 2,68 x 10<sup>5</sup> ufc/pez determinaron una DL<sub>50</sub> de 1,69 x 10<sup>5</sup> ufc/ml, en que 10 peces de 5,9 gramos fueron mantenidos en acuarios de aproximadamente 17 L, en un desafío durante 30 días a una temperatura promedio de 10 °C.

Álvarez y col (2006) inocularon vía im una suspensión de 0,05 ml conteniendo desde 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> ufc en peces de 5 a 7 g a una temperatura promedio de 12 °C. Calculando la DL<sub>50</sub> en 8,37 x 10<sup>6</sup> y 1,03 x 10<sup>5</sup> ufc/ml para dos cepas distintas, utilizando el método de cálculo de Reed y Muench.

Si bien la DL<sub>50</sub> obtenida en el presente estudio es más alta que las obtenidas en otros, es importante destacar que se utilizaron peces de un peso mayor, lo que influye directamente en el resultado del experimento. Tomando en cuenta además diferencias tales como: la virulencia del aislado, el origen de los peces y número de peces en el acuario; que influyen la presión de infección, según lo descrito por Madsen (1998). Además de lo señalado por Amend (1981) en su trabajo de criterios para pruebas de potencia de vacunas, donde hace mención a que peces más grandes son generalmente más resistentes a las enfermedades, por lo tanto, requieren una mayor concentración bacteriana para lograr reproducir la enfermedad.

Este estudio se enmarca dentro de una serie de estudios realizados por otros investigadores y que puede ser utilizado para la determinación de la eficacia de vacunas para la prevención de la Flavobacteriosis, en estudios de patogenia y posteriores investigaciones en lo que respecta a inmunoprofilaxis en truchas arcoiris principalmente.

## CONCLUSIONES

Fue posible reproducir la Flavobacteriosis mediante inoculación intramuscular pudiendo determinarse la  $DL_{50}$ , por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada.

La  $DL_{50}$  determinada para truchas arco iris (*O. mykiss*) de 15 – 40 g inoculadas intramuscularmente con la cepa en estudio de *F. psychrophilum* fue de  $10^{7,33}$  ufc/ml.

El cuadro clínico tuvo tendencia a la cronicidad, debido a la presentación de lesiones típicas de la enfermedad.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez B, P Secades, M Prieto, MJ Mc Bride, JA Guijarro. 2006. A mutation in *Flavobacterium psychrophilum tlpB* inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 72, 4044-4053.
- 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, Basel.
- 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. Capítulo 16. Versión en Español editada por Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Buenos Aires.
- Aravena P. 2006. Caracterización de cepas de *Flavobacterium psychrophilum* por métodos bioquímicos, serológicos y moleculares. *Memoria de Titulación*, Escuela de Tecnología Médica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Austin B, M Stobie. 1991. Recovery of yellow pigmented bacteria from dead and moribund fish during outbreaks of rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum), fry syndrome in England. *J Fish Dis* 14, 677-682.
- Austin B, D Austin. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Pp 225-249. Praxis publishing Ltd, Chichester.
- Bernardet J, B Kerouault. 1989. Phenotypic and genomic studies of “*Cytophaga psychrophila*” isolated from diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl Environ Microbiol* 55, 1796-1800.
- Bernardet J, P Segers, M Vancanneyt, F Berthe, K Kersters, P Vandamme. 1996. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int J Syst Bacteriol* 46, 128-148.
- Brown L, WT Cox, RP Levine. 1997. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis Aquat Org* 29, 213-218.

- Bustos P, J Calbuyahue, J Montaña, B Opazo, P Entrala, R Solervicens. 1995. First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 13, 30-32.
- Cerro A del, I Márquez, J Guijarro. 2002. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* y *Yersinia ruckeri* three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 68, 5177-5180.
- Cipriano R, R Holt. 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet N° 86. United State Dept. of the Interior. U.S.Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Keameysville.
- Cristi M. 2003. Evaluación de la eficacia de dos vacunas experimentales bivalentes para el control de Septicemia Rickettsial del salmón (SRS) y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Crump E, M Perry, S Clouthier, W Kay. 2001. Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 67, 750-759.
- Crump E, J Burian, P Allen, W Kay. 2005. Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiol* 151, 3127-3135.
- Dalsgaard I. 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish. *Ann Rev Fish Dis* 3, 127-144.
- Daskalov H, DA Austin, B Austin. 1999. An improved growth medium for *Flavobacterium psychrophilum*. *Letters in Applied Microbiology* 28, 297-299.
- Decostere A, E D'Haese, M Lammens, H Nelis, F Haesebrouck. 2001. *In vivo* study of fagocytosis, intracellular survival and multiplication of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), spleen phagocytes.
- Ekman E, H Börjeson, N Johansson. 1999. *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon (*Salmo salar*) brood fish and their offspring. *Dis Aquatic Org* 37, 159-163.
- Ekman E. 2003. Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Evensen O, E Lorenzen. 1996. An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilum* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Dis Aquatic Org* 25, 53-61.

- Garcia C, F Pozet, C Michel. 2000. Standardization of experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* the agent of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry syndrome. *Dis Aquat Org* 42, 191-197.
- Holt RA, JS Rohovec, JL Fryer. 1993. Bacterial cold-water disease. En: Inglis V, R J Roberts, N Bromage (eds). *Bacterial Diseases of Fish*. Pp. 3-22. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Inglis V, J Roberts, N Bromage. 1993. *Bacterial Diseases of Fish*. Bacterial cold-water disease. Pp. 3-22. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Jurado R. 1989. Concepto de Toxicidad Aguda, Crónica y Remota. Metodología de la Determinación de la DL<sub>50</sub>. En: Jurado R (ed). *Toxicología Veterinaria*. Pp. 40-45. Salvat editores S.A., Madrid.
- Kondo M, K Kawai, K Kurohara, S Oshima. 2002. Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Microb Infect* 4, 279-283.
- LaFrentz BR, SE LaPatra, GR Jones, JL Congleton, B Sun, KD Cain. 2002. Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative per cent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 25, 703-713.
- Lehmann J, D Mock, FJ Stüremberg, JF Bernardet. 1991. First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids. *Dis Aquat Org* 10, 217-220.
- Lorenzen E, I Dalsgaard, JF Bernardet. 1997. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies. *Dis Aquat Org* 31, 197-208.
- Lumsden JS, VE Ostland, HW Ferguson. 1996. Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus*. *J Fish Dis* 19, 113-119.
- Madetoja J, P Nyman, T Wiklund. 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 43, 27-38.
- Madetoja J, I Dalsgaard, T Wiklund. 2002. Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish farming environments. *Dis Aquat Org* 52, 109-118.
- Madetoja J, LG Lönnström, C Björkblom, G Uluköy, G Bylund, C Syvertsen, K Gravningen, EA Norderhus, T Wiklund. 2006. Efficacy of injection vaccines against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 29, 9-20.

- Madsen L, I Dalsgaard. 1998. Characterization of *Flavobacterium psychrophilum*; comparison of proteolytic activity and virulence of strains isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. En: *Methodology in fish diseases research*. Barnes A, AG Davidson, M Hiney, D McIntosh (eds). Pp. 47-52. Fisheries Research Service, Aberdeen.
- Madsen L, I Dalsgaard. 1999. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 36, 169-176.
- Madsen L, I Dalsgaard. 2000. Comparative studies of Danish *Flavobacterium psychrophilum* isolates: ribotypes, plasmid profiles, serotypes and virulence. *J Fish Dis* 23, 211-218.
- Madsen L, JD Moller, I Dalsgaard. 2005. *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. *J Fish Dis* 28, 39-47.
- Martínez JL, A Casado, R Enríquez. 2004. Experimental infection of *Flavobacterium psychrophilum* in fins of Atlantic salmon *Salmo salar* revealed by scanning electron microscopy. *Dis Aquat Org* 59, 79-84.
- Michel C. 1980. A standardized model of experimental Furunculosis in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aquat Sci* 37, 746-750.
- Michel C, C Garcia. 2003. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet Res* 34, 127-132.
- Navarrete. 2004. Evaluación de la potencia de una vacuna experimental para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Nematollahi A, A Decostere, F Pasmans, F Haesebrouck. 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonids fish. *J Fish Dis* 26, 563-574.
- Olabuenaga S. 2000. Sistema inmune en peces. *Guyana Concepción* 64, 205-215.
- Organización Internacional de Epizootias (O.I.E). 2006. Diagnostic Manual of Aquatic Animal Diseases. Fifth edition. OIE, Paris.
- Ostland VE, DG McGrogan, HW Ferguson. 1997. Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. *J Fish Dis* 20, 443-451.

- Ostland VE, PJ Byrne, G Hoover, HW Ferguson. 2000. Necrotic myositis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 23, 329-336.
- Pacha R. 1968. Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. *Appl Microbiol* 16, 97-101.
- Rahman MH, A Kuroda, JM Dijkstra, I Kirku, T Nakanishi, M Ototake. 2002. The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish and Shellfish Imm* 12, 169-179.
- Rangdale RE, RH Richards, DJ Alderman. 1999. Histopathological and electron microscopical observations on rainbow trout fry syndrome. *Vet Rec* 144, 251-254.
- Riofrío P. 2003. Caracterización microbiológica, bioquímica y serológica de aislados chilenos de *Flavobacterium psychrophilum* y sensibilidad a antimicrobianos. *Tesis de Magister*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Schmidtke LM, J Carson. 1995. Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia. *Dis Aquat Org* 21, 157-161.
- Secades P, B Álvarez, JA Guijarro. 2001. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 67, 2436-2444.
- Treuquemil CS. 2005. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) 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.





**Anexo 2.** Registro diario de temperatura (AM y PM) del agua de los acuarios de truchas arcoiris (*O. mykiss*) de 15 – 40 g inoculados vía intramuscular y subcutánea con una cepa nacional de *F. psychrophilum*.

| <b>Dias pi</b>  | <b>Fecha</b> | <b>Temp. AM</b> | <b>Temp. PM</b> | <b>Promedio</b> |
|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1               | 11-07        | 12,8            | 13,5            | 13,15           |
| 2               | 12-07        | 9,7             | 10,8            | 10,25           |
| 3               | 13-07        | 8,5             | 9,1             | 8,8             |
| 4               | 14-07        | 7               | 9               | 8               |
| 5               | 15-07        | 8,5             | 10              | 9,25            |
| 6               | 16-07        | 10,8            | 12,3            | 11,55           |
| 7               | 17-07        | 12              | 13,5            | 12,75           |
| 8               | 18-07        | 12,6            | 13,1            | 12,85           |
| 9               | 19-07        | 13              | 13,5            | 13,25           |
| 10              | 20-07        | 12              | 13,5            | 12,75           |
| 11              | 21-07        | 12              | 13              | 12,5            |
| 12              | 22-07        | 10,8            | 12,3            | 11,55           |
| 13              | 23-07        | 10,1            | 12,6            | 10,1            |
| 14              | 24-07        | 12,3            | 13,5            | 12,6            |
| 15              | 25-07        | 9,8             | 12,6            | 11,2            |
| 16              | 26-07        | 9,5             | 11,5            | 10,5            |
| 17              | 27-07        | 8,5             | 10,8            | 9,65            |
| 18              | 28-07        | 7,2             | 10              | 8,6             |
| 19              | 29-07        | 7,3             | 11,2            | 9,25            |
| 20              | 30-07        | 5,8             | 10,8            | 8,3             |
| 21              | 31-07        | 5,5             | 10,7            | 8,1             |
| 22              | 01-08        | 6               | 9,8             | 7,9             |
| 23              | 02-08        | 7,8             | 10              | 8,9             |
| 24              | 03-08        | 11              | 12              | 11,5            |
| 25              | 04-08        | 11,5            | 14              | 12,75           |
| 26              | 05-08        | 10,5            | 13              | 11,75           |
| 27              | 06-08        | 9               | 10,5            | 9,75            |
| 28              | 07-08        | 8               | 11              | 9,5             |
| 29              | 08-08        | 11              | 12,5            | 11,75           |
| 30              | 09-08        | 11,1            | 12,8            | 11,95           |
| <b>Promedio</b> |              | <b>9,72</b>     | <b>11,76</b>    | <b>10,74</b>    |

**Anexo 3.** Registro de mortalidad diaria y acumulada en trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 – 40 g post inoculación (pi) vía im con  $10^7$  ufc/pez de *F. psychrophilum*.

| <b>Días post<br/>inoculación</b> | <b>Mortalidad<br/>diaria</b> | <b>Mortalidad<br/>diaria<br/>acumulada</b> | <b>% mortalidad<br/>acumulada<br/>(n=30)</b> |
|----------------------------------|------------------------------|--|--|
| 1                                | 0                            | 0  | 0  |
| 2                                | 0                            | 0  | 0  |
| 3                                | 0                            | 0  | 0  |
| 4                                | 0                            | 0  | 0  |
| 5                                | 0                            | 0  | 0  |
| 6                                | 0                            | 0  | 0  |
| 7                                | 0                            | 0  | 0  |
| 8                                | 1                            | 1  | 3,3  |
| 9                                | 2                            | 3  | 9,9  |
| 10                               | 6                            | 9  | 29,7   |
| 11                               | 0                            | 9  | 29,7   |
| 12                               | 0                            | 9  | 29,7   |
| 13                               | 2                            | 11   | 36,3   |
| 14                               | 2                            | 13   | 42,9   |
| 15                               | 2                            | 15   | 49,5   |
| 16                               | 0                            | 15   | 49,5   |
| 17                               | 0                            | 15   | 49,5   |
| 18                               | 0                            | 15   | 49,5   |
| 19                               | 0                            | 15   | 49,5   |
| 20                               | 0                            | 15   | 49,5   |
| 21                               | 3                            | 18   | 59,4   |
| 22                               | 0                            | 18   | 59,4   |
| 23                               | 0                            | 18   | 59,4   |
| 24                               | 0                            | 18   | 59,4   |
| 25                               | 1                            | 19   | 62,7   |
| 26                               | 0                            | 19   | 62,7   |
| 27                               | 0                            | 19   | 62,7   |
| 28                               | 1                            | 20   | 66,6   |
| 29                               | 0                            | 20   | 66,6   |
| 30                               | 0                            | 20   | 66,6   |
| <b>Total</b>                     | <b>20</b>                    | <b>20</b>                                  | <b>66,6</b>                                  |

**Anexo 4.** Registro de mortalidad diaria y acumulada en trucha arcoiris (*O. mykiss*) de 15 – 40 g post inoculación (pi) vía im con  $10^6$  ufc/pez de *F. psychrophilum*.

| <b>Días post<br/>inoculación</b> | <b>Mortalidad<br/>diaria</b> | <b>Mortalidad<br/>diaria<br/>acumulada</b> | <b>% mortalidad<br/>acumulada<br/>(n=30)</b> |
|----------------------------------|------------------------------|--|--|
| <b>1</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>2</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>3</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>4</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>5</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>6</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>7</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>8</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>9</b>                         | 0                            | 0  | 0  |
| <b>10</b>                        | 3                            | 3  | 9,9  |
| <b>11</b>                        | 0                            | 3  | 9,9  |
| <b>12</b>                        | 0                            | 3  | 9,9  |
| <b>13</b>                        | 0                            | 3  | 9,9  |
| <b>14</b>                        | 0                            | 3  | 9,9  |
| <b>15</b>                        | 1                            | 4  | 13,2   |
| <b>16</b>                        | 0                            | 4  | 13,2   |
| <b>17</b>                        | 0                            | 4  | 13,2   |
| <b>18</b>                        | 0                            | 4  | 13,2   |
| <b>19</b>                        | 1                            | 5  | 16,6   |
| <b>20</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>21</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>22</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>23</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>24</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>25</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>26</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>27</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>28</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>29</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>30</b>                        | 0                            | 5  | 16,6   |
| <b>Total</b>                     | <b>5</b>                     | <b>5</b>                                   | <b>16,6</b>                                  |

## 9. AGRADECIMIENTOS

- A mi Gran Familia por su confianza e incondicionalidad.
- A mis hermanas Sandra y Mirna, Fernando mi cuñado fundamentales a la hora de preguntar por la evolución de mi carrera.
- Al Dr. Ricardo Enríquez profesor patrocinante, por su apoyo, paciencia y optimismo.
- Sra. Mónica Monrás, Dra. Margarita Concha, Dra. Vania Quinteros y Esteban Henríquez. Por sus consejos y asistencia técnica.
- A mis amigos Millaray Fuenzalida, Claudia García, Patricia Monckton, Jaime Ojeda por su amistad y apoyo, especialmente en el periodo de realización del experimento y escrito.
- A mis amigos Nelly Pérez, Grisel Navarro, Caterina Kunstmann, Bruno Rubilar, por hacer más agradable el paso por la Universidad.
- A la familia Nieto – Giubergia (Fernando, Maita, Fernandito, Javiera), por soportarme durante tantos años.
- Principalmente a Jesucristo mi Salvador.