



FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA

**INFORMES TECNICOS F I P**

FIP - IT / 93 - 29

INFORME : PROGRAMA DE VIGILANCIA DE  
FINAL : PATOLOGIAS DE SALMONIDEOS  
CULTIVADOS EN LA ZONA SUR  
AUSTRAL

UNIDAD : ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR  
EJECUTORA : UNIVERSIDAD CATOLICA DE  
VALPARAISO

Universidad Católica de Valparaíso  
Facultad de Recursos Naturales  
Escuela de Ciencias del Mar  
Casilla 1020 - Valparaíso - Chile

FIP Proyecto 23

---

---

**PROGRAMA DE VIGILANCIA DE PATOLOGIAS DE  
SALMONIDEOS CULTIVADOS EN LA ZONA SUR AUSTRAL**

---

---

**INFORME FINAL**

Valparaíso, marzo de 1995

**PROGRAMA DE VIGILANCIA DE PATOLOGÍAS DE SALMONÍDEOS  
CULTIVADOS EN LA ZONA SUR AUSTRAL.**

**PROYECTO No.23; CODIGO : FIP 025-94-01**

**REQUIRENTE:** Fondo de Investigación Pesquera (FIP)

Convenio aprobado por Decreto Supremo N° 426 del 19 de agosto de 1994, del Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción.

**CONTRAPARTE:** Universidad Católica de Valparaíso  
Facultad de Recursos Naturales

**UNIDAD EJECUTORA:** Escuela de Ciencias del Mar  
Facultad de Recursos Naturales  
UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

Instituto de Fomento Pesquero  
Corporación de Fomento de la Producción  
MINISTERIO DE PLANIFICACION Y DESARROLLO

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:**

Mariel Campalans Barnier.  
Escuela de Ciencias del Mar  
San Cristóbal 563, PUERTO MONTT.

Distribución de Ejemplares

---

10 Fondo de Investigación Pesquera  
1 Dirección Escuela de Ciencias del Mar  
1 Instituto de Fomento Pesquero  
1 Investigador Responsable del Proyecto

---

## SINTESIS EJECUTIVA

---

Se diseña un Prototipo de Sistema de Vigilancia de Enfermedades de Alto Riesgo que afectan a los salmónidos cultivados en las regiones X, XI y XII. Para tal efecto, se investigaron las principales patologías que afectan a estas especies durante el proceso de cultivo, definiendo aquellas de alto riesgo y sus áreas de distribución a través de información acumulada de los años 1992 a 1994. Esta recopilación de información se realizó a través de encuestas diferenciadas a centros de cultivos y laboratorios ictiopatólogicos.

El análisis de la información de las encuestas permitió confeccionar un catastro de enfermedades presentes y georreferenciar aquellas definidas como de alto riesgo. Estadísticamente no se encontraron asociaciones relevantes entre la aparición de enfermedades factores ambientales y las prácticas de manejo.

Se propone la metodología de muestreo para la puesta en marcha y funcionamiento del sistema de vigilancia que recibirá, procesará y analizará la información proveniente de monitoreo de las diferentes regiones sectorizadas.

Se presenta un esquema de la puesta en marcha y administración del sistema de vigilancia de patologías elaborado para actuar en un plan que permitirá prevenir, detectar, controlar o erradicar las enfermedades de alto riesgo.

Se establecen los métodos y procedimientos estandarizados de diagnóstico prevención y tratamiento básico para las enfermedades consideradas en las recomendaciones del administrador del sistema.

---

## CONTENIDO GENERAL

	Pág.
INTRODUCCION .....	1
CATASTRO DE ENFERMEDADES DETECTADAS EN LABORATORIOS Y ESTABLECIMIENTOS DE CULTIVOS DE SALMONIDOS .....	3
DISEÑO Y APLICACION DE LAS ENCUESTAS .....	8
SELECCION DE LOS CENTROS A ENCUESTAR .....	9
ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA INFORMACION OBTENIDA .....	11
I. ACTIVIDADES GENERALES .....	12
II.- PATOLOGIAS QUE SE HAN PRESENTADO .....	24
DISTRIBUCION DE PATOLOGIAS DE ALTO RIESGO .....	38
DISEÑO DE UN PROGRAMA DE VIGILANCIA Y DETECCION PRECOZ DE ENFERMEDADES DE MAYOR PREVALENCIA .....	46
CREACION DEL PROTOTIPO COMPUTACIONAL .....	48
1. FORMULACION DE REQUERIMIENTOS .....	49
2. DISEÑO CONCEPTUAL .....	51
3. IMPLEMENTACION DEL DISEÑO .....	68
MANUAL DE USUARIO .....	70
PUESTA EN MARCHA DEL SISTEMA DE ALERTA .....	84
ESTANDARIZACION DE METODOS Y PROCEDIMIENTOS DE DIAGNOSIS, PREVENCION Y TRATAMIENTO .....	91
BIBLIOGRAFIA .....	94
ANEXOS .....	97
FORMULARIOS DE ENCUESTA DIRIGIDOS A LOS CENTROS DE CULTIVO FORMULARIOS DE ENCUESTA DIRIGIDOS A LOS LABORATORIOS DE ASISTENCIA ICTIOPATOLOGICA	

**PROGRAMA DE VIGILANCIA DE PATOLOGÍAS DE SALMONÍDEOS  
CULTIVADOS EN LA ZONA SUR AUSTRAL.**

por

**M. Campalans B., P. Rojas Z., J.I. Sepúlveda V.<sup>a</sup>**

**R. Castro D.<sup>b</sup>**

**I. Guerrero S. y J. Pascual S.<sup>c</sup>**

**1. INTRODUCCION**

La situación geográfica de nuestro país, así como las barreras naturales que lo separan de otros países, han favorecido por mucho tiempo la condición sanitaria de los salmónidos contribuyendo a retardar la llegada de muchas enfermedades conocidas como peligrosas en otras latitudes, a pesar que, desde comienzo de este siglo, se han introducido peces o sus ovas al país. En un comienzo, las cuarentenas obligadas a que eran sometidas las ovas, por el largo viaje, contribuyeron a esta situación. Pero, el desarrollo de medios rápidos de transporte así como el incremento de los volúmenes importados, han aumentado la probabilidad de introducir enfermedades en el territorio nacional.

---

<sup>a</sup> Escuela de Ciencias del Mar. U.C.V.

<sup>b</sup> Instituto de Fomento Pesquero. Zonal Xa. Región

<sup>c</sup> Instituto de Estadística. U.C.V.

La gran mayoría de las enfermedades descritas en el país se caracterizan por su distribución cosmopolita y de peligrosidad muy condicionada a situaciones ambientales desfavorables al pez. A excepción de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) y de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), reportadas en nuestro país en 1970 y 1983 respectivamente, la mayoría de los agentes patógenos muestran escasa selectividad de huésped, razón por la cual resultaría cuestionable imputar su ocurrencia a la importación de ovas o de peces desde lugares donde también se encuentran presentes.

En los últimos años, la aparición de dos agentes patógenos, importantes por su virulencia, *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri*, ha promovido el desarrollo de mejores métodos de detección y la adopción de medidas tendientes a minimizar su ocurrencia.

Los laboratorios de diagnóstico de enfermedades de salmónidos, sean estos fiscales, semifiscales o privados, se mantienen relativamente al día en cuanto a las técnicas de diagnóstico. Los esfuerzos para controlar las enfermedades involucran acciones multidisciplinarias, a lo cual debe agregarse el grado de conciencia sanitaria del sector productivo. Por lo general, las empresas que cuentan con los recursos humanos, técnicos y materiales para hacer frente a los problemas de salud de sus stocks, adoptan medidas de prevención y control de enfermedades, muchas otras sólo recurren a los servicios ictiopatológicos cuando se manifiestan índices de mortalidad inusuales. Considerando que el agua es un posible portador de germen patógeno mucho más eficiente que el aire, este desequilibrio respecto a la condición sanitaria de los stocks que comparten sistemas lacustres, fluviales o marinos, hace que los esfuerzos de algunas empresas por mantener o mejorar el estado sanitario de dichos sistemas sean totalmente infructuosos.

Con el fin de visualizar las áreas de cultivo que podrían presentar mayor o menor riesgo de pérdidas por enfermedad, es de fundamental importancia conocer la prevalencia y la distribución geográfica de las patologías presentes tanto en los sistemas lacustres como fluviales y marinos. Por otra parte, tanto los factores ambientales como el manejo propio del

proceso productivo pueden constituir elementos que favorecen o no la proliferación de los agentes patógenos. En consecuencia, es igualmente importante la selección de aquellas variables que, en mayor medida inciden en la manifestación de los problemas patológicos.

El conocimiento del estado ictiosanitario actual, de la distribución de las patologías, así como de los factores que contribuyen a su desarrollo en las distintas áreas de la zona de estudio contribuirá a dar bases para diseñar un sistema de vigilancia y de alerta temprana. Un plan de este tipo permitiría adelantarse a situaciones de riesgo y tomar medidas que protejan la producción de los salmónidos en cultivo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Diseñar un sistema de monitoreo y de alerta temprana de patologías de salmónidos cultivados en las Regiones X, XI y XII.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Realizar un catastro de las enfermedades detectadas en los laboratorios y en los establecimientos de cultivo de salmónidos, identificando particularmente aquellas consideradas como de alto riesgo.
2. Determinar áreas geográficas en las aguas continentales (lacustres y fluviales) y marítimas (aguas interiores) de las Regiones X, XI y XII, clasificadas según la prevalencia de las patologías consignadas en el catastro.
3. Diseñar un programa de detección precoz de enfermedades de mayor prevalencia, con énfasis en aquellas clasificadas como de alto riesgo en base a monitoreo y análisis de factores de riesgo ambiental y biológicos.
4. Establecer métodos y procedimientos estandarizados de diagnóstico, prevención y tratamiento básico de cada una de las enfermedades consideradas en el programa de detección precoz.

# CATASTRO DE ENFERMEDADES DETECTADAS EN LABORATORIOS Y ESTABLECIMIENTOS DE CULTIVO DE SALMONIDOS

El primer incidente documentado en relación a la presencia de parásitos en peces nativos lo hizo Wood (1970), al indagar los motivos de las mortalidades que se habrían producido entre las truchas y salmones de cultivo en la piscicultura de LAUTARO. Así, en 1970 se habrían diagnosticado 2 o 3 parásitos y un par de enfermedades bacterianas en perca trucha. En la misma oportunidad Wood detectó los mismos parásitos y enfermedades bacterianas mencionadas, esta vez en truchas y salmones, pero agregó además una peligrosa enfermedad característica sólo en salmones, la ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑÓN (BKD), la que se diseminó desde Río Blanco (V Región), lugar de recepción de las ovas importadas a Polcura y Lautaro y otras zonas donde se liberaron los peces sobrevivientes, constituyendo éste, el primer registro de introducción y diseminación de una enfermedad exótica (SNYDER, 1971). Reyes en 1985 hace una reseña de los problemas patológicos que afectaban a los salmónidos cultivados hasta esa fecha, cuyos resultados se resumen en el cuadro de la página siguiente.

En 1988 - 1989, las Universidades Católica de Valparaíso y Austral de Chile realizaron un estudio tendiente a conocer la magnitud de los problemas ictiosanitarios presentes en los cultivos intensivos, estudio en el cual se estableció que el problema más importante fueron los hallazgos de BKD crónico tanto en fase marina como de agua dulce con una ocurrencia estacional diferente para salmón coho y del atlántico.

ENFERMEDADES OBSERVADAS EN SALMONIDOS EN CHILE

(Reyes, 1985).

<u>ENFERMEDAD</u>	<u>AGENTE CAUSAL</u>	<u>HUESPED</u>	<u>LOCALIDAD</u>
<b><u>VIRALES</u></b>			
Necrosis Pancreática Infecciosa	Virus de la Necrosis Pancreática	<i>S. gairdneri</i>	X Región
<b><u>BACTERIANAS</u></b>			
Septicemia por <i>Aeromonas</i> Móviles	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>S. gairdneri</i> <i>O. kisutch</i>	Regiones Metropo- litana y X Region
Septicemia Hemorrágica Columnaris	<i>Pseudomonas</i> spp.  <i>Flexibacter</i> <i>columnaris</i>	<i>S. gairdneri</i> <i>O. kisutch</i> <i>O. kisutch</i> <i>S. gairdneri</i>	X Región  Regiones IX y X
Micrococcus Mixo- bacterias	<i>Micrococcus</i> sp. Myxobacterias no identificadas	<i>S. gairdneri</i> <i>O. kisutch</i>	X Región X Region
<b><u>PARASITARIAS</u></b>			
Saprolegniasis	<i>Saprolegnia</i> sp.	Todas las especies	Muy dis- tribuída
Costiasis	<i>Ichtyobodo necatrix</i>	<i>S. gairdneri</i>	Región Metropo- litana.
Quilodonelasis	<i>Chilodonella cyprini</i>	<i>O. kisutch</i>	X Región
Tricodinosis	<i>Trichodina</i> sp.	<i>S. gairdneri</i>	I Región
Copepodosis	<i>Caligus teres</i>	<i>O. kisutch</i>	X Región
Ergasilosis	<i>Ergasilus</i> sp.	<i>O. kisutch</i>	X Región
Gloquideosis	<i>Diplodon chilensis</i>	<i>O. kisutch</i>	X Región
Helmintosis	<i>Hepatoxylon</i> <i>trichiuri</i>	<i>S. trutta</i> <i>O. tchawytscha</i>	X Región
<b><u>NUTRICIONALES</u></b>			
Aflatoxicosis	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>S. gairdneri</i>	X Región

En el mismo estudio se hace mención de la aparición de una nueva patología llamada en esa época "Síndrome del Salmón Coho", cuyo nombre obedecía a que inicialmente se pensó que era exclusiva de esa especie. Estudios posteriores demostraron su patogenicidad para otras especies de cultivo ( Cvitanich et al., 1991 ). En 1993, Lannan y Fryer identifican al agente de estas epizootias como *Piscirickettsia salmonis* nov.gen., nov.sp., causante de la Piscirickettsiosis o Septicemia Rickettsial de Salmónidos (SRS).

El siguiente trabajo realizado por las mismas entidades universitarias durante 1991 a 1992 encuentra una presencia constante de BKD aunque en una prevalencia menor que en el estudio anterior, atribuída en ese informe a los tratamientos permanentes para controlar el Síndrome Rickettsial del Salmón, enfermedad que en ese momento se detectó también en otras especies en cultivo y en otras áreas de la X Región. Sólo en 1994, se reporta por primera vez la presencia de SRS en el lago Llanquihue (Bravo, 1994). En los resultados se menciona además el hallazgo de *Yersinia* sp. en peces silvestres de lago. En 1992 se reporta el brote de *Yersinia ruckeri* afectando a salmones cultivados en la X Región durante noviembre de 1991 a julio de 1992 (Toledo et al, 1992).

La expansión de los cultivos hacia otras zonas geográficas (XI y XII Región), ha traído consigo la diseminación de patologías como el SRS en la XI Región (IFOP, com. pers.). Se hace necesario entonces, conocer los registros de las enfermedades que están ocurriendo actualmente en los lugares donde se concentra la producción de salmónidos.

Considerando que, para el objetivo general del presente proyecto, era necesario disponer de información actualizada de las patologías que afectan a los cultivos de especies salmonídeas de las Regiones X, XI y XII, se planificó la aplicación de encuestas, tanto a los Centros de Cultivo de las regiones de interés, como a los Laboratorios de Asistencia Patológica.

## DISEÑO Y APLICACION DE LAS ENCUESTAS

Para la recolección de información en los Centros de Cultivo, se diseñaron dos tipos de formularios, uno de ellos dirigido a los Centros de Cultivo de aguas de mar (CCAM) y el otro, a los de aguas continentales (CCAC) (Ver Anexo A). También se diseñó un formulario dirigido a los Laboratorios de Asistencia Ictiopatólogica, (LAI) (Ver Anexo B). Todos los formularios se estructuraron, principalmente, en base a preguntas cerradas.

Aún cuando las encuestas a los Centros de Cultivo se diseñaron para ser aplicadas a través de entrevista personal, la imposibilidad de obtener a tiempo la georeferenciación de los centros, la exigencia planteada por la Asociación de Salmonicultores, para conocer los formularios anticipadamente, así como también el constatar que, en general, las empresas mantienen en sus oficinas centrales la información de cada uno de sus Centros de Cultivo, obligó a modificar el método de aplicación de las encuestas. Como una primera etapa, a fin de sensibilizar a los ejecutivos de las empresas y a los miembros de la Asociación de Salmonicultores con respecto a los objetivos de la encuesta y así conseguir un alto porcentaje de respuestas con información de buena calidad, se sostuvo entrevistas con los directivos de la Asociación y se envió carta informativa a los gerentes o jefes de producción u operación de las empresas. Además, en la XI y XII región, se envió carta a los ictiopatólogos involucrados, reforzando la información enviada a los ejecutivos de las empresas.

Posteriormente, una vez realizado el contacto con las empresas que debían ser encuestadas, se les envió una cantidad de formularios correspondientes al número de sus centros de cultivos de especies de salmónidos que se encontraban operando, de acuerdo a nómina entregada por SERNAP. Esto permitió que las empresas contaran con tiempo suficiente para recolectar la información solicitada de cada uno de sus Centros, antes de que se les visitara para retirar las encuestas y/o resolver las dudas que se hubiesen presentado. En la mayoría de los casos en que no fue posible entrevistarse con la persona designada por la empresa para este proceso, o en que la información estaba incompleta al momento de la entrevista, las empresas devolvieron los formularios respondidos, por correo.

Pese a todos estos esfuerzos por obtener la información requerida, es necesario precisar que, en muchos casos, las empresas no respondieron las encuestas para todos sus centros, ni completaron la encuesta en aquellos ítemes que decían relación con las patologías y su mortalidad.

Al igual que los formularios para encuestar a los Centros de Cultivo, el formulario LAI, se diseñó en base a preguntas cerradas, considerando el método de entrevista personal a los encargados de los Laboratorios. Según la información disponible, la población de Laboratorios de Asistencia Ictiopatólogica estaría formada por: INTA, Fundación Chile, Trouw Suralim, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile, Ictiopatología de la Universidad Austral, Laboratorio Veterquímica, y los laboratorios de las propias empresas cultivadoras de salmónidos. Como se trata de una población pequeña y de relativamente fácil acceso, se solicitó la participación en el proceso a la totalidad de los laboratorios señalados, obteniéndose una excelente respuesta.

#### **SELECCION DE LOS CENTROS A ENCUESTAR**

Para la selección de los centros a encuestar, se consideró que la población bajo estudio está definida por los centros de cultivo de especies de salmónidos que se encuentran operando en las regiones X, XI y XII. El parámetro utilizado para determinar los centros que se encuentran operando fue el hecho de haber registrado cosecha durante el período 1992-1993. De acuerdo a la última información entregada por SERNAP, los centros de cultivo que conformaron la población de interés, se distribuyen en las regiones bajo estudio, como se muestra en la Tabla I.

Tal como se planteó en la propuesta, los centros a ser encuestados se seleccionaron mediante un censo en las regiones XI y XII y de un muestreo en la X región. La selección de la muestra en la X región, se realizó mediante un muestreo estratificado por conglomerados, considerando como unidad que define el conglomerado a cada empresa propietaria de uno o más centros de cultivo.

**TABLA I.- CENTROS DE CULTIVO POR REGION.**

Región	Número de centros de cultivo operando	%
X	295	85.8
XI	33	9.6
XII	16	4.6
TOTAL	344	100

Los estratos se definieron de acuerdo al número de centros que poseen las empresas, es así que, el Estrato 1 lo constituyen las empresas con más de tres centros de cultivo, en tanto que el Estrato 2 lo conforman las empresas restantes. La distribución del número de empresas y de centros por estrato, se presenta en la Tabla II.

**TABLA II.- EMPRESAS Y CENTROS DE CULTIVO POR ESTRATO**

Estrato	Número de empresas	Número de centros
1	23	155
2	91	140
TOTAL	114	295

El estrato 1 fue censado, y en el estrato 2 se tomó una muestra de 20 empresas, con un total de 37 Centros de Cultivo. Este tamaño de muestra se obtuvo mediante un muestreo aleatorio simple, considerando un nivel de confianza del 80 %, un error de precisión de 0.12 en la estimación de las proporciones de interés y una función de costo constante por conglomerado. Esto último se debió a que la mayoría de las personas con las que había que contactarse para responder las encuestas, se podían ubicar en lugares de fácil acceso. Por lo general, estos lugares eran las oficinas administrativas de las empresas.

De la muestra seleccionada en la X Región, no fue posible contactarse con cuatro empresas, y otras dos empresas tenían centros que no estaban operando. La mayoría de las empresas del Estrato 1, aduciendo razones de tiempo, respondieron sólo lo correspondiente

a algunos de sus centros, es así que 40 empresas contestaron las encuestas con información de 66 centros de cultivo.

De los 33 centros de cultivo operando con salmónidos en la XI región, se pudo establecer contacto con sólo 28 de ellos. Por otra parte, debido a que dos empresas de esta región, se negaron a responder la encuesta y un Centro de agua dulce no se encuestó, puesto que recién está desarrollando su primer ciclo de cultivo, se recibió información de 15 empresas con un total de 19 centros, lo cual consituye un 67.9 % de la población de interés.

En la XII región, 14 empresas respondieron las encuestas correspondientes a 16 centros de cultivo.

### ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA INFORMACION OBTENIDA

A continuación, se presenta un análisis descriptivo de la información recibida por los ejecutores del proyecto. Para este análisis se han procesado 101 encuestas a centros de cultivo que corresponden a 40 empresas de la X Región, 15 de la XI Región y 14 de la XII Región, y siete encuestas provenientes de los laboratorios de asistencia ictiopatólogica. La Tabla III muestra la distribución de las encuestas a los centros por tipo de formulario y región. Además, proporciona el porcentaje que representan estas cantidades en relación al número de centros seleccionados en la región respectiva.

**TABLA III.- ENCUESTAS RECIBIDAS POR REGION.**

Región	Aguas conti- nentes	Agua de mar	Total (%)
X	19	47	66 (34.4)
XI	7	12	19 (67.9)
XII	6	10	16 (100.0)
TOTAL	32	69	101 (46.1)

Luego, se resume la información relevante proporcionada por los centros de cultivo y los laboratorios, a través de las encuestas. En primer lugar, se da un perfil de las actividades generales que en ellos se realizan y, posteriormente, el análisis se enfoca hacia las patologías que han afectado a los cultivo de salmónidos en las tres regiones bajo estudio.

## **I.- ACTIVIDADES GENERALES**

### **I.1. CENTROS DE CULTIVO DE AGUAS CONTINENTALES**

Para cada una de las regiones de interés en este estudio, las tablas IV, V, VI y VII muestran la distribución de frecuencia de los centros de aguas continentales que respondieron la encuesta. La tabla IV los clasifica según la etapa de inicio de su proceso productivo, mientras que la tabla V se refiere a las instalaciones de cultivo que poseen dichos centros; la tabla VI los agrupa respecto a los elementos de higiene que poseen y la tabla VII los relaciona con los desinfectantes que utilizan en ropa y equipo.

Con respecto a la asistencia ictiopatólogica que recibe el centro, mayoritariamente proviene de los Laboratorios de la misma empresa (50.0%) o de Laboratorios particulares no universitarios (43.8%). La frecuencia con que el centro recibe este servicio es variable; 8 centros son asistidos semanalmente, 3 lo hacen quincenalmente, 4 mensualmente y en 13, este tipo de asistencia es realizada con otra frecuencia, la cual depende de las necesidades del momento. Un centro declara no recibir asistencia ictiopatólogica y otros 3 no dan información al respecto.

TABLA IV.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN ETAPA DE INICIO DEL PROCESO PRODUCTIVO, POR REGION.

REGION	ETAPA DE INICIO			
	Ovas	Alevines	Pre-Smolt	Total
X	10	8	1	19
XI	6	1	0	7
XII	6	0	0	6
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>32</b>

TABLA V.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN INSTALACIONES DE CULTIVO QUE POSEE , POR REGION.

REGION	INSTALACIONES DE CULTIVO			
	Salas de Incubación	Estanques de Alevinaje	Balsas-Jaulas	Otras Instalaciones
X	9	10	10	4
XI	6	7	1	0
XII	6	6	1	1
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>12</b>	<b>5</b>

TABLA VI.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN ELEMENTOS DE HIGIENE QUE POSEE, POR REGION.

ELEMENTOS DE HIGIENE	REGION			
	X	XI	XII	Total
Sólo Pediluvio	2	1	0	3
Sólo Maniluvio	0	0	1	1
Pediluvio y Maniluvio	13	3	3	18
Pediluvio y Rodiluvio	1	0	0	1
Pediluvio, Maniluvio y Rodiluvio	1	0	1	2
No responde	2	3	1	6
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>32</b>

TABLA VII.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN DESINFECTANTE QUE UTILIZA EN ROPAS Y EQUIPOS, POR REGION.

DESINFECTANTES	REGION			
	X	XI	XII	Total
Cloro	5	0	4	9
Yodóforos	16	4	5	25
Amonios cuatemarios	10	3	1	14
Formalina	1	0	0	1
No responde	2	3	0	5

### I.1.a) Centros que poseen Salas de Incubación

Los 22 centros que inician su proceso productivo con ovas, las cultivan en sus propias instalaciones; 6 de ellos utilizan además Salas de Incubación de otros centros.

La tabla VIII presenta el número de estos centros, según los antecedentes sanitarios que ellos exigen a las ovas; en esta tabla, se anota entre paréntesis el porcentaje con respecto al total de centros que incuban ovas. Se destaca que casi la totalidad de ellos exigen que los reproductores sean tratados con antibióticos.

Con respecto a los manejos preventivos que se aplican a las ovas, la mayoría de los centros (81.8%) declara aplicar desinfección con yodóforo.

En la tabla IX se presenta el número de centros, por especie de las ovas que cultivan, en cada región en estudio.

Resultados de interés relacionados con el catastro de enfermedades en ovas, se presentan a continuación:

- Ningún centro declaró haber tenido brote de hidrocèle.
- En la X Región, 8 centros (90%) expresaron haber tenido brotes de Hongos en los tres últimos años, registrando mortalidades que variaron entre el 0.02 y el 50 % anual por dicha causa. Dos centros declararon brotes de bacterias; en uno de ellos se presentó mixobacteriosis asociada a limpieza de los estanques, provocando una mortalidad del 5% anual; en el otro, el brote se debió a bacterias sulfoferrosas por uso de agua de pozo, lo cual produjo una mortalidad del 80% en el año 1993.
- En la XI Región, un centro evidenció brote de Hongos con una mortalidad promedio asociada del 35% anual; otro registró una mortalidad por aborto del 28% en 1994.

TABLA VIII.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN ANTECEDENTES SANITARIOS DE LAS OVAS QUE CULTIVA.

ANTECEDENTES SANITARIOS	Nº DE CENTROS	(%)
Ninguno	0	( 0.0)
Ovas certificadas libres de virus	16	(72.7)
Reproductores sometidos a screening	13	(59.1)
Reproductores tratados con antibióticos	20	(90.9)
Otros antecedentes	2	( 9.1)

TABLA IX.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, POR REGION Y POR ESPECIE DE OVAS QUE CULTIVAN.

REGION	ESPECIE		
	Salar	Coho	Trucha
X	9	8	9
XI	2	6	5
XII	1	5	2
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>16</b>

- En la XII Región, sólo un centro declaró haber tenido brotes de enfermedad en ovas, registrando mortalidades del 0.25% , promedio anual, por hongos y entre el 8 y el 70% anual por coagulación del saco vitelino.

A continuación se listan los Métodos de Diagnóstico y Tratamientos que han utilizado los centros encuestados, para las diversas patologías en ovas.

PATOLOGIA	METODO DE DIAGNOSTICO	TRATAMIENTO
HONGOS	- a simple vista - bajo lupa - frotis húmedo - frotis teñido	- solución salina - verde malaquita - formalina - oxitetraciclina*
HIDROCELLE	- a simple vista - bajo lupa	no informado
BACTERIAS	- a simple vista* - microbiológico del agua - microscopio	- desinfectantes - antibióticos
COAGULACION DE VITELO	- a simple vista - bajo lupa - bacteriología	- eliminación

\* Se estima se trata de una respuesta equivocada de parte de los encuestados.

#### I.1.b) Centros que poseen Estanques de Alevinaje.

Los 23 centros que tienen Estanques de Alevinaje, se distribuyen, según la especie que cultivan, como se muestra en la tabla X. Las tablas XI y XII resumen la información proporcionada por los centros respecto a la periodicidad en la limpieza de los estanques y en la extracción de la mortalidad, respectivamente.

TABLA X.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, POR REGION Y POR ESPECIE DE ALEVINES QUE CULTIVAN.

REGION	ESPECIE		
	Salar	Coho	Trucha
X	8	8	8
XI	1	6	4
XII	1	6	1
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>13</b>

TABLA XI.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN PERIODICIDAD EN LA LIMPIEZA DE LOS ESTANQUES, POR REGION.

REGION	PERIODICIDAD				Total
	Diaria	Semanal	Otra	No responde	
X	9	0	0	1	10
XI	4	0	2	1	7
XII	1	4	1	0	6
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>23</b>

TABLA XII.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN PERIODICIDAD EN LA EXTRACCION DE LA MORTALIDAD.

REGION	PERIODICIDAD			Total
	Diaria	Otra	No responde	
X	9	1	0	10
XI	5	1	1	7
XII	5	1	0	6
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>23</b>

I.1.c) Centros que poseen Balsas-Jaulas.

La tabla XIII muestra la distribución de los centros que tienen Balsas-Jaulas, de acuerdo a la especie que cultivan.

TABLA XIII.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, POR REGION Y POR ESPECIE DE PRE-SMOLT QUE CULTIVAN.

REGION	ESPECIE		
	Salar	Coho	Trucha
X	8	5	5
XI	1	1	1
XII	0	2	0
<b>TOTAL</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>6</b>

La Tabla XIV entrega información dada por los centros respecto a la frecuencia en la extracción de la mortalidad

TABLA XIV.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN FRECUENCIA EN LA EXTRACCION DE LA MORTALIDAD.

REGION	PERIODICIDAD				
	Diaria	Cada 3 días	Semanal	Otra	Total
X	0	4	7	1	13
XI	0	1	0	0	1
XII	1	0	1	0	2
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>15</b>

## I.2. CENTROS DE CULTIVO DE AGUAS MARINAS

La Tabla XV muestra el número de encuestados, por especie que cultiva, para cada una de las tres regiones bajo estudio. De esa tabla, se puede apreciar que, tanto el Salmón Salar como el Salmón Coho se cultivan en más del 50% de los centros de la X Región y que el Salmón Coho es la especie que se cultiva en casi la totalidad de los centros de las regiones XI y XII. Además se puede inferir que, en promedio, se cultiva una a dos especies por centro.

Respecto de la periodicidad con que se realiza el cambio de mallas de las Balsas-Jaulas, la gran mayoría de los centros (61.8%), declara usar una periodicidad variable, que depende de la estación del año y del uso de antifouling, lo que no permite establecer un patrón que pudiera ser asociado a la aparición de alguna patología.

Por otra parte, la tabla XVI permite inferir la falta de uniformidad entre los centros, con respecto a la frecuencia de extracción de la mortalidad. Es así que el 14.7% de los centros, declara hacerlo diariamente, subentendiéndose que se refieren a la mortalidad de superficie; el 41.2% dice efectuarla semanalmente, mientras que el 32.3% extrae la mortalidad con una frecuencia variable, dependiendo de si se trata de mortalidad de superficie o de fondo.

En lo que se refiere a elementos de higiene con que cuenta el centro, en la tabla XVII se puede observar que casi la totalidad de los centros encuestados (86.8%) poseen Pediluvio, Maniluvio y Recipiente para desinfección de utensilios. Esto evidencia, en este aspecto la preocupación de los acuicultores por la mantención de la higiene de su centro. A lo anterior se contrapone la poca preocupación por evitar la propagación de patógenos, al no manejar convenientemente las aguas de sangre de cosecha. Esto se evidencia al constatar que 8 centros no utilizan desinfectante alguno, que 16 centros devuelven las aguas de sangre de cosecha a la planta de proceso y que 10 no responden. De los 34 centros restantes, 24 utilizan Cloro solo o en mezcla.

TABLA XV.- CENTROS DE AGUA DE MAR, POR REGION Y POR ESPECIE QUE CULTIVAN

REGION	ESPECIE			
	Salar	Coho	Trucha	Chinook
X	26	25	20	1
XI	1	11	6	0
XII	1	10	3	0
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>46</b>	<b>29</b>	<b>1</b>

TABLA XVI.- CENTROS DE AGUA DE MAR, SEGUN FRECUENCIA EN LA EXTRACCION DE LA MORTALIDAD.

REGION	PERIODICIDAD			Total
	Diaria	Semanal	Otra	
X	8	21	17	<b>46</b>
XI	4	4	3	<b>11</b>
XII	5	3	2	<b>10</b>
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>28</b>	<b>22</b>	<b>67</b>

TABLA XVII.- CENTROS DE AGUA DE MAR, SEGUN ELEMENTOS DE HIGIENE QUE POSEE, POR REGION.

ELEMENTOS DE HIGIENE	REGION			
	X	XI	XII	Total
Sólo Pediluvio	0	1	0	1
Pediluvio y Maniluvio	2	0	0	2
Pediluvio y Recipiente para desinfección de utensilios	3	1	0	4
Pediluvio, Maniluvio y Recipiente para desinfección de utensilios	41	8	10	59
No responde	0	2	0	2
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>68</b>

TABLA XVIII.- CENTROS DE AGUA DE MAR, SEGUN FRECUENCIA CON QUE RECIBE ASISTENCIA ICTIOPATOLOGICA.

REGION	PERIODICIDAD					Total
	Mensual	Quincenal	Semanal	Otra	Nunca	
X	12	15	9	9	1	46
XI	7	0	2	2	0	11
XII	0	0	0	10	0	10
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>67</b>

En cuanto a Asistencia Ictiopatólogica, la mayoría de estos centros son asistidos por Laboratorios de la propia empresa (41.2%), por Laboratorios particulares no universitarios (52.9%) o por Laboratorios asociados a insumos (36.8%). La distribución de las respuestas dadas a la pregunta "Frecuencia con que el centro recibe asistencia ictiopatólogica" se muestra en la tabla XVIII. De ella es posible deducir que la periodicidad con que un centro recibe este servicio depende de la región en que se encuentra. Se destaca el hecho de que el 100% de los centros de la XII Región, respondió "Otra frecuencia", la cual, en la mayoría de los casos, fue especificada con un "cuando se requiera"; ésto estaría indicando que la periodicidad con que el centro recibe este tipo de apoyo es muy variable y está determinada por la necesidad del momento.

### **I.3 LABORATORIOS DE ASISTENCIA ICTIOPATOLOGICA**

La encuesta fue respondida por 7 Laboratorios, 2 de los cuales están asociados a empresas de cultivo, 3 son de instituciones universitarias, uno es de tipo fiscal y el otro es de tipo privado, no asociado a empresas de cultivo. En general, estos Laboratorios realizan tanto actividades de servicios como de investigación, desarrollando la Bacteriología como su línea de trabajo preferencial. En particular, uno de estos Laboratorios realiza sólo actividades de servicios y otro trabaja exclusivamente en investigación en Virología.

Con respecto a las actividades apoyadas por los Laboratorios para el perfeccionamiento de sus profesionales, todos los encuestados manifestaron haber recibido visita de expertos durante el período 1992-1994, con una periodicidad que varió desde "ocasionalmente" hasta "dos veces por año".

En lo que respecta al personal profesional, la mayoría de los Laboratorios encuestados cuentan con al menos 4 profesionales, en su mayoría Médicos Veterinarios o Bioquímicos, los cuales declaran un tiempo promedio de 4.4 años de experiencia en el área ictiopatólogica y de 4.2 años de antigüedad en el Laboratorio en el que actualmente trabajan. Se destaca el hecho de que en una de estas instituciones, trabaja sólo un profesional del área.

## II.- PATOLOGIAS QUE SE HAN PRESENTADO

Al responder las encuestas, todos los centros debieron responder un anexo por cada especie que cultivan. En él se les requirió información acerca de los brotes de los principales patógenos que se registraron en el centro durante el período 1992-1994. Aunque no es sorprendente, se destaca el hecho que gran cantidad de los encuestados no entregó esta información. A continuación se presenta un resumen con los aspectos importantes de esa información.

### II.1 CENTROS DE CULTIVO DE AGUAS CONTINENTALES

Con el fin de poder determinar si es que alguna patología estaba asociada o no con la etapa de desarrollo del cultivo, a estos centros se les solicitó especificar dicha etapa en el anexo. La tabla XIX resume el número de anexos recibidos, por región, según etapa de desarrollo.

TABLA XIX.- ANEXOS RECIBIDOS, SEGUN ETAPA DE DESARROLLO DE LA ESPECIE, POR REGION.

REGION	ETAPA DE DESARROLLO			Total
	Alevinaje	Engorda	Ignorada	
X	18	15	6	39
XI	14	3	0	17
XII	7	1	1	9
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>19</b>	<b>7</b>	<b>65</b>

La periodicidad en los muestreos y recuentos de peces para cada etapa de cultivo, se muestran las tablas XX y XXI, respectivamente. La tabla XXII resume la densidad de carga que los centros utilizan habitualmente en cada etapa de desarrollo por especie.

Con respecto a patologías que se han presentado, no todos los centros están dispuestos a proporcionar información. Es así que, solamente en 32 de los 65 anexos recibidos, había algún tipo de respuesta en cuanto a brotes de patógenos. Se hace notar que no se contó con la correspondiente información de los centros de la XII Región.

En la tabla XXIII se muestra, por región y por patología, el porcentaje de centros que reportaron brote y mortalidades asociadas. Entre paréntesis, se anota la máxima mortalidad anual, asociada a cada patógeno, alcanzada en alguno de dichos centros. Ningún centro encuestado declaró haber sido afectado por IPN, Leucemia Viral o ICH durante el período 1992-1994. En los 3 centros que declararon haber estado afectado por BKD, ésta se presentó en alevines de salmón coho. En un centro de la XII Región, también se presentó en salmónes coho de balsas jaulas.

El brote de SRS se registró en 1992, en las tres especies que el centro cultivaba en Balsas-jaulas. Por otra parte, el brote de ERM, que se registró en 1992, se presentó en las balsas jaulas con salmónes coho.

TABLA XX.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN PERIODICIDAD EN LOS MUESTREOS, POR ETAPA DE DESARROLLO.

FRECUENCIA	ETAPA DE DESARROLLO		
	Alevinaje	Engorda	Ignorada
Semanal	0	1	0
Quincenal	19	10	0
Mensual	20	7	7
No responde	0	1	0
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>19</b>	<b>7</b>

TABLA XXI.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN PERIODICIDAD EN LOS RECUENTOS, POR ETAPA DE DESARROLLO.

FRECUENCIA	ETAPA DE DESARROLLO		
	Alevinaje	Engorda	Ignorada
Semanal	0	0	0
Quincenal	0	0	0
Mensual	4	0	0
Otra frecuencia	35	16	7
No responde	0	3	0
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>19</b>	<b>7</b>

TABLA XXII.- CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES, SEGUN DENSIDAD DE CARGA, POR ETAPA DE DESARROLLO.

DENSIDAD \ ESPECIE	ETAPA DE DESARROLLO								
	Alevinaje			Engorda			Ignorada		
	Salar	Coho	Trucha	Salar	Coho	Trucha	Salar	Coho	Trucha
Hasta 5 [kg/m <sup>3</sup> ]	0	1	2	3	4	3	0	0	0
De 5 a 10 [kg/m <sup>3</sup> ]	1	5	1	4	1	2	3	1	1
De 10 a 15 [kg/m <sup>3</sup> ]	2	3	2	0	0	0	0	0	1
De 15 a 20 [kg/m <sup>3</sup> ]	3	5	2	1	1	0	1	0	0
De 20 a 25 [kg/m <sup>3</sup> ]	4	3	2	0	0	0	0	0	0
Más de 25 [kg/m <sup>3</sup> ]	0	1	2	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

TABLA XXIII.- PORCENTAJE DE CENTROS DE AGUAS CONTINENTALES QUE PRESENTARON LA PATOLOGIA DURANTE 1992-1994, POR REGION. (Mortalidad máxima)

PATOLOGIAS	REGION		
	X	XI	Total
BKD	5.3 ( 2.0%)	28.6 ( 3.0%)	11.5
SRS	5.3 ( 7.0%)	0 ---	3.8
Yersiniosis	5.3 ( 4.4%)	0 ---	3.8
Septicemia Bacteriana	26.3 ( 50.0%)	28.6 ( 80.0 %)	26.9
Hongos	26.3 ( 22.0%)	28.6 ( 32.0%)	26.9
Otras	5.3 ( 5.0%)	0 ---	3.8

A continuación se listan los Métodos de Diagnóstico y Tratamientos reportados por los centros para el control de enfermedades .

PATOLOGIA	METODO DE DIAGNOSTICO	TRATAMIENTO
BKD	- Tinción Gram - IFAT/DFAT - Elisa	- Desdobles - Eritromicina - Oxitetraciclina
SRS	- Tinción Gram - IFAT/DFAT	- Acido Oxolínico
YERSINIOSIS	- <i>Frotis húmedo</i> * - Tinción Gram - Bioquímico - Inmunodifusión	- Acido Axolínico - Sulfadoxina + Trimetoprim
SEPTICEMIA BACTERIANA	- <i>Frotis húmedo</i> * - Tinción Gram - Bioquímico	- Desdoble - Flumequina - Oxitetraciclina - Sulfadoxina + Trimetoprim
HONGOS	- Frotis húmedo - <i>Tinción Gram</i> *	- Desdoble - Baños con Oxitetraciclina

\* Se estima es una respuesta equivocada por parte de los encuestados

## II.2 CENTROS DE CULTIVO DE AGUAS MARINAS

Estos centros proporcionaron 103 anexos los que indican que, independientemente de la especie sobre la cual informan y de la región donde está ubicado el centro, los muestreos se realizan habitualmente en forma mensual. En cuanto a los recuentos, estos se hacen con otra periodicidad que en muchos casos es trimestral o más alejada.

Con respecto a las patologías que se han detectado, en 35 anexos se omite la información. En las tablas XXIV y XXV se muestra, para cada patología, el porcentaje de centros que reportaron brotes y mortalidades asociadas, clasificados por región y especie, respectivamente. En ambas tablas se anota entre paréntesis la máxima mortalidad anual alcanzada por alguno de dichos centros.

TABLA XXIV.- PORCENTAJE DE CENTROS DE AGUA DE MAR QUE PRESENTARON LA PATOLOGIA DURANTE 1992-1994, POR REGION. (Mortalidad máxima)

PATOLOGIAS	REGION			
	X	XI	XII	Total
BKD	27.6 (28.2%)	41.7 (14.6%)	20.0 (22.6%)	29.0
SRS	63.8 (54.0%)	8.3 (20.0%)	0 ---	44.9
Septicemia Bacteriana	6.4 (10.0%)	0 ---	0 ---	4.3
Myxobacteriosis	2.1 (1.5%)	16.7 (20.0%)	0 ---	4.3
Copépodos	12.8 (54.0%)	0 ---	0 ---	8.7
Otras	2.1 (5.0%)	16.7 (8.0%)	0 ---	4.3

TABLA XXV.- PORCENTAJE DE CENTROS DE AGUA DE MAR QUE PRESENTARON LA PATOLOGIA DURANTE 1992-1994, POR ESPECIE. (Mortalidad máxima)

PATOLOGIAS	ESPECIE			
	Salar	Coho	Trucha	Chinook
BKD	17.9 (12.0%)	28.3 (28.2%)	3.4 (1.2%)	100.0 (18.0%)
SRS	46.4 (13.2%)	39.1 (35.0%)	34.5 (54.0%)	0 ---
Septicemia Bacteriana	3.6 (3.8%)	2.2 (10.0%)	3.4 (5.0%)	0 ---
Myxobacteriosis	0	4.3 (20.0%)	3.4 (5.0%)	0 ---
Copépodos	0	0	20.7 (54.0%)	0 ---
Otras	3.6 (5.0%)	4.3 (8.0%)	0	0 ---

A continuación se listan los Métodos de Diagnóstico y Tratamientos que han declarado utilizar los centros, para el control de enfermedades:

PATOLOGIA	METODO DE DIAGNOSTICO	TRATAMIENTO
BKD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Frotis húmedo*</i></li> <li>- Tinción Gram</li> <li>- Inmunodifusión</li> <li>- IFAT/DFAT</li> <li>- Elisa</li> <li>- <i>ECP en cultivo celular*</i></li> <li>- Histología</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desdobles</li> <li>- Acido oxolínico</li> <li>- Eritromicina</li> <li>- Oxitetraciclina</li> <li>- Sulfametazina</li> <li>- Sulfadoxina + Trimetoprim</li> </ul>
SRS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tinción Gram</li> <li>- <i>Bioquímico*</i></li> <li>- Inmunodifusión</li> <li>- IFAT/DFAT</li> <li>- Elisa</li> <li>- Histología</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desdoble</li> <li>- Acido oxolínico</li> <li>- Flumequina</li> <li>- Oxitetraciclina</li> <li>- Quinolonas</li> <li>- Eliminación</li> <li>- Baytril</li> <li>- Adrocil</li> </ul>
SEPTICEMIA BACTERIANA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tinción Gram</li> <li>- Bioquímico</li> <li>- IFAT/DFAT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acido Oxolínico</li> <li>- Eritromicina</li> <li>- Oxitetraciclina</li> </ul>
MYXO BACTERIOSIS	(no se registran)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxitetraciclina</li> </ul>
COPEPODOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apreciación visual</li> <li>- Necropsia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nuvan</li> <li>- Diclorvos</li> <li>- Ivermentina</li> </ul>
SEPTICEMIA HEMORRAGICA Tipo Moraxella	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aislamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxitetraciclina</li> </ul>

\* Llama la atención la inconsistencia de las respuestas dadas por algunos centros respecto del patógeno y el método de diagnóstico utilizado

Al igual que los centros de cultivo de salmónidos de aguas continentales, los parámetros ambientales que habitualmente registran la mayoría de los centros de agua de mar para medir la calidad del agua son Temperatura, Oxígeno, Salinidad, Turbidez. A continuación se presentan algunos gráficos que permiten observar las variaciones de la temperatura del agua que, dentro de un mismo mes, han registrado los centros de aguas marinas, en las balsas jaulas, al momento de detectarse la presencia de algún patógeno de importancia.

Dada la poca información recibida, sólo es posible entregar rangos de variación de temperatura por mes, asociada a brotes de SRS (Gráficos 1 y 2), BKD (Gráfico 3), Copépodos en la X Región (Gráfico 4) y BKD en la XI Región (Gráfico 5).

Desde el Gráfico 1 se puede apreciar una variación de las temperaturas extremas en los meses de abril, septiembre, noviembre y diciembre que llama poderosamente la atención. De la revisión de la información proporcionada por los encuestados se constató que esto se debe a las temperaturas mínimas proporcionada por un solo centro. Asumiendo la posibilidad de un error en el registro de ese centro, se construyó el Gráfico 2 excluyendo dicha información, resultando así más consistente, en términos visuales, con los Gráficos 3 y 4.

GRAFICO 1: Variación de Temperatura Asociada a Brotes de SRS - X Región

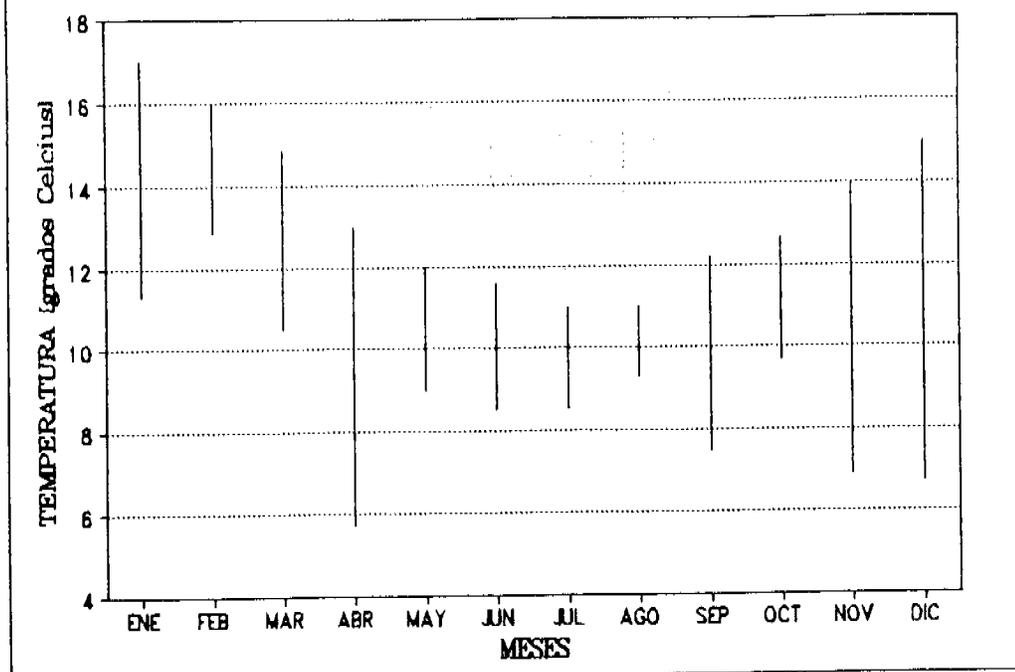


GRAFICO 2: Variación de Temperatura Asociada a Brotes de SRS - X Región

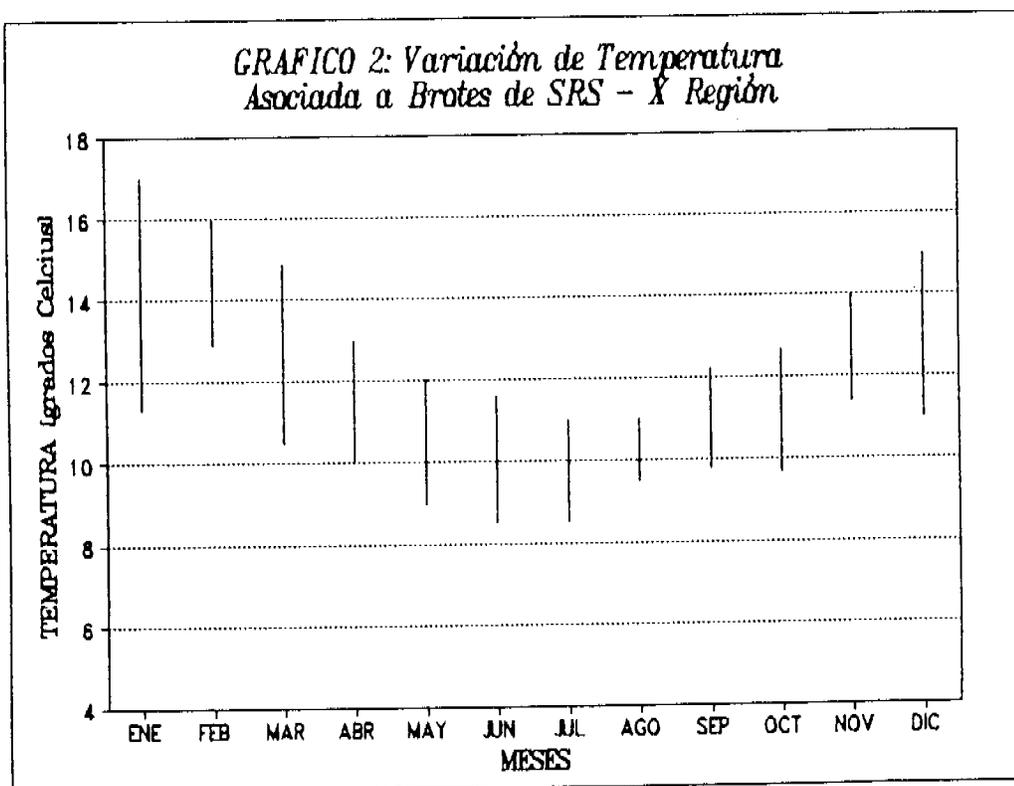


GRAFICO 3: Variación de Temperatura Asociada a Brotes de BKD - X Región

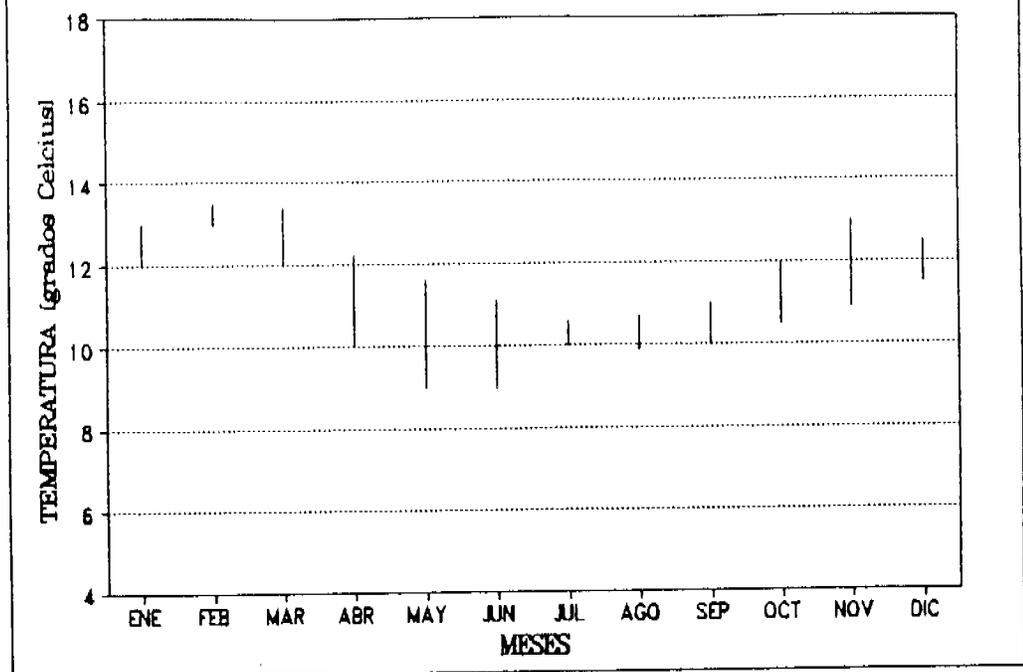


GRAFICO 4: Variación de Temperatura Asociada a Brotes de Copéodos - X Región

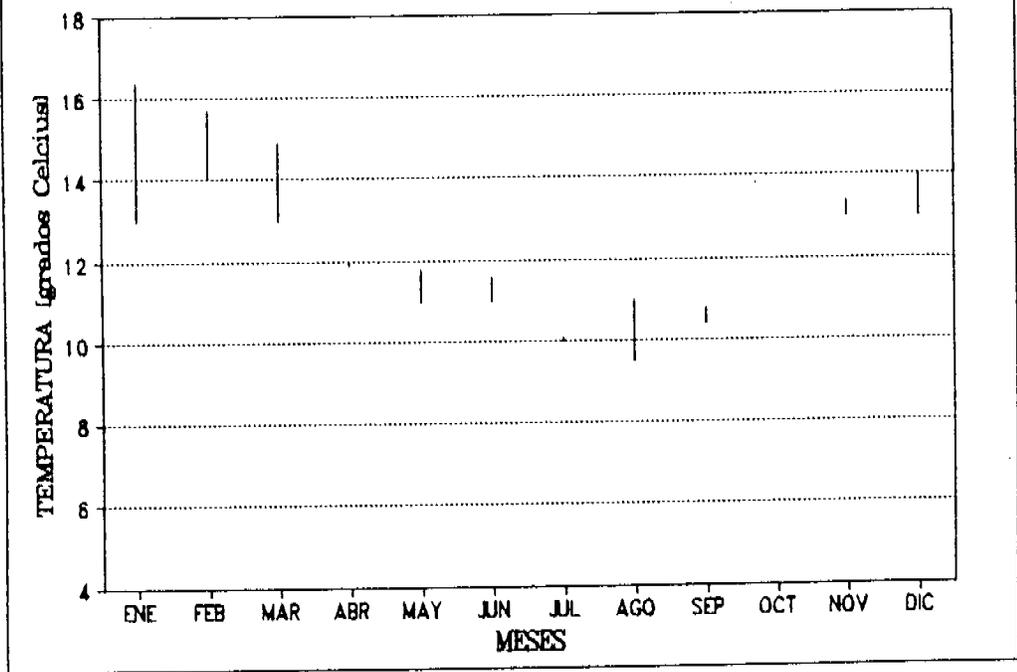
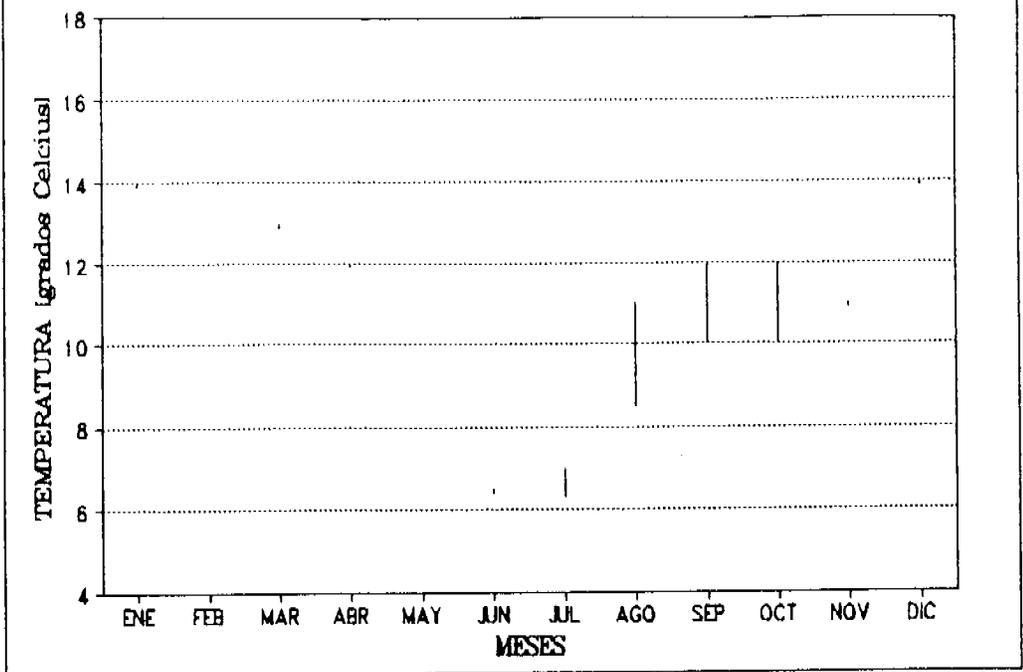


GRAFICO 5: Variación de Temperatura Asociada a Brotes de BKD - XI Región



## II.3 LABORATORIOS

A fin de obtener antecedentes para establecer criterios que ayuden a definir los Laboratorios Autorizados, a los Laboratorios encuestados se consultó acerca de las técnicas que utilizan para identificar los distintos agentes patológicos; por el equipamiento asociado a Identificación de Patógenos con que cuenta el Laboratorio y por características generales de los profesionales que laboran en ellos. Los Cuadros 1 y 2 presentan, para los distintos agentes reportados, el o los métodos de identificación que mayoritariamente utilizan los encuestados.

CUADRO 1

AGENTES VIRALES Y PARASITARIOS	METODOS DE IDENTIFICACION
IPNV IHNV	Efecto citopatológico Seroneutralización
Retrovirus	Efecto Citopatológico Microscopía Electrónica
Saprolegnia ICH Hexamita Ergasilus Caligus	Observación directa

Además de los agentes virales y parasitarios especificados en el Cuadro 1, y que corresponden a los identificados por la mayoría de los Laboratorios que realizan actividades en esa línea de trabajo, un Laboratorio declaró haber identificado Argulus y Dyphillobothrium mediante observación directa, otro identificó EIBS utilizando Tinción Giemsa, Histología y Microscopía Electrónica y un tercero indicó la identificación de PKD a través de Histología y métodos Inmunohistoquímicos.

CUADRO 2

AGENTES BACTERIANOS	METODOS DE IDENTIFICACION
BKD	Tinción Gram Anticuerpos Fluorescentes
SRS	Tinción Gram Anticuerpos Fluorescentes Efecto Citopatológico
ERM Aeromonas Pseudomonas Vibrios	Batería Bioquímica Baterías Api
Myxobacterias	Tinción Gram Cultivo en Agar
Pasteurella	Batería Bioquímica Baterías Api Tinción Gram

Además de lo listado en el Cuadro 2, un Laboratorio declaró haber identificado RTFS y Carnobacterium, utilizando para ello, entre otros métodos, Batería Bioquímica, Baterías Api, Sensidiscos y Tinción Gram.

El Cuadro 3 resume la información correspondiente a equipamiento.

CUADRO 3

EQUIPAMIENTO	Nº de Laboratorios
Cámaras Estériles	2
Cámaras de Flujo Laminar	7
Centrífuga Refrigerada	5
Congelador -70°C	2
Congelador de Nitrógeno para Células	4
Equipo Histológico	2
Homogeneizador	6
Incubador	7
Kit de Filtración de reactivos y medios líquidos	7
Microscopio Electrónico	1
Microscopio Epifluorescencia	5
Microscopio Optico	7
Otros	6

De la información presentada en el cuadro anterior, se deduce que todos los laboratorios encuestados cuentan con un equipamiento mínimo, que comprende Cámaras de Flujo Laminar, Incubadores, Kit de filtración de reactivos y medios líquidos y Microscopio óptico.

La información proporcionada por los 7 Laboratorios de Ictiopactología encuestados, respecto a los agentes que ellos han aislado durante el período 1992-1994, se resume en el cuadro siguiente, en el cual se muestra la distribución de frecuencia de los Laboratorios por agente y por año.

AGENTE AISLADO	1992	1993	1994
BKD	3	4	2
SRS	3	5	4
YERSINIA	1	2	1
AEROMONAS	3	3	2
PSEUDOMONAS	4	3	2
MYXOBACTERIAS	4	4	3
VIBRIOS	0	1	0
IPN	0	1	0
IHN	0	0	1
MICROSPORIDIOS	0	1	1
ICH	3	3	2
SAPROLEGNIA	4	4	4
CALIGUS	2	3	3
ERGASILUS	1	1	1
HEXAMITA	3	4	1
DIPLOSTOMUM	1	1	1
ARGULUS	1	1	1
DIPHYLLOBOTHRIUM	1	1	1
RTFS	2	2	2

## DISTRIBUCION DE PATOLOGIAS DE ALTO RIESGO

La actividad salmonera comercial chilena se ha desarrollado principalmente en la Xa. Región, donde se concentra aproximadamente el 90% de las empresas que se dedican al cultivo intensivo de salmónidos. La masiva concentración de centros de cultivo en un área reducida, representa un problema real dado el alto riesgo que significa la propagación de enfermedades infecciosas de un centro a otro, como asimismo la contaminación de aguas consideradas libres de patógenos (CORFO-APSTCh, 1992).

Como de alto riesgo se consideraron las siguientes patologías: Enfermedad bacteriana del riñón (BKD), Septicemia rickettsial de salmónidos (SRS), Necrosis pancreática infecciosa (IPN), Necrosis hematopoyetica infecciosa (IHN), Leucemia plasmacitoídea (PL), Septicemia hemorrágica viral (VHS), Enfermedades de salmónidos por Herpesvirus , Síndrome de los Cuerpos de Inclusión Eritrocíticos (EIBS), Furunculosis, Enfermedad de Hitra, y la Edwardsiellosis, de acuerdo a las siguientes definiciones:

## DEFINICIONES

La Ley General de Pesca y Acuicultura, en el Título IV, párrafo II, Artículo 86, dice textualmente:

"EL MINISTERIO, MEDIANTE DECRETO SUPREMO PREVIOS INFORMES TÉCNICOS FUNDADOS DE LA SUBSECRETARÍA, Y DEL CONSEJO NACIONAL DE PESCA, DICTARÁ UN REGLAMENTO QUE ESTABLECERÁ LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL PARA EVITAR LA INTRODUCCIÓN DE ENFERMEDADES DE ALTO RIESGO Y ESPECIES QUE CONSTITUYAN PLAGAS, AISLAR SU PRESENCIA EN CASO DE QUE ÉSTAS OCURRAN, EVITAR SU PROPAGACIÓN Y PROPENDER A SU ERRADICACIÓN. EL MISMO REGLAMENTO DETERMINARÁ LAS PATOLOGÍAS QUE SE CLASIFICAN COMO DE ALTO RIESGO Y LAS ESPECIES HIDROLÓGICAS QUE CONSTITUYAN PLAGAS".

Debido a que no se define el término de "enfermedad de Alto riesgo" y que el reglamento a que se hace mención no ha sido publicado, para efectos de la aplicación del Sistema diseñado en el presente estudio, serán llamadas Enfermedades de Alto Riesgo (EAR), aquellas enfermedades que significan riesgo para la producción por presentar las características siguientes:

- No controlable.
- De naturaleza contagiosa.
- Con mortalidades mayores a 10% acumulada por brote.
- Secuelas asociadas (tumores, deformidades esqueléticas, bajo crecimiento y presencia de peces portadores).

Las enfermedades que cumplen con estas características se han dividido en dos grupos dependiendo si están o no presentes en el país.

El primer grupo lo componen aquellas enfermedades cuya presencia está confirmada en el país. El segundo grupo está compuesto por:

- \* enfermedades que habiendo sido informadas por algún laboratorio su presencia no está confirmada, por lo que se incluye como de presencia presunta.
- \* enfermedades que no están presentes en el país ni ha sido informada su aparición, de tal modo que su primera aparición constituiría un hecho de relevancia que motivaría una alerta roja y las acciones correspondientes.

Se destaca la inclusión en este grupo de sólo una enfermedad parasitaria, porque aunque estas son en su mayoría de ciclo conocido, en el caso de *Ceratomyxa shasta* su ciclo de transmisión es desconocido y no hay tratamiento efectivo. Existe además, el riesgo de introducción al país junto con las ovas importadas desde la Costa del Pacífico de los Estados Unidos, donde se han registrado mortalidades asociadas a dicha patógeno.

## PRIMER GRUPO

### ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑÓN

- \*otras denominaciones : BKD, KD, Renibacteriosis
- \*agente : *Renibacterium salmoninarum*
- \*transmisión : Vertical y horizontal
- \*efectos : mortalidades importantes o moderadas, pero sostenidas en el tiempo, bajo crecimiento en lotes afectados, mala calidad del producto final.

### SEPTIMEMIA RICKETTSIAL DE SALMONIDOS

- \*otras denominaciones : SRS, Síndrome del Salmón Coho, Piscirickettsiosis.
- \*agente : *Piscirickettsia salmonis*
- \*transmisión : horizontal y posiblemente vertical
- \*efectos : mortalidad superior al 10%, bajo crecimiento mala calidad del producto final.

## NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA

- \*otras denominaciones : IPN
- \*agente : **IPN-V o virus de la IPN**
- \*transmisión : Horizontal y Vertical (en la cual estaría implicado el macho (KINKELIN et al., 1985)
- \*efectos : La mortalidad está influenciada por la temperatura. A 14 - 15°C puede ser 80% pero sólo 20% a 10°C (Fryer, 1989).

## SEGUNDO GRUPO

### NECROSIS HEMATOPOYETICA INFECCIOSA

- \*otras denominaciones : IHN
- \*agente : **INH-V o virus de la IHN**
- \*transmisión : Vertical (en la cual podría estar implicado el macho (KINKELIN et al. 1985)) y horizontal.
- \*efectos : altas mortalidades en alevines 80% a 10°C (Fryer, 1989). Las pérdidas exceden el 80 a 90% en ciertos brotes, con alta incidencia de portadores (Winton et al., 1983)

### LEUCEMIA PLASMACITOIDEA

- \*otras denominaciones : (PL), Anemia marina
- \*agente : **Virus de la leucemia del Salmón. (Retrovirus)**
- \*transmisión : desconocida (posible cofactor un microsporidio: *Enterozoosoon salmonis*)(KENT y DAWE 1993)
- \*efectos : Altas mortalidades (en Salmones de cultivo en Canadá) (NEWBOUND B.C., 1991)

### SEPTICEMIA HEMORRAGICA VIRAL

- \*otras denominaciones : VHS, Enfermedad de Egtved, Virus de Egtved.
- \*agente : **VHS-V o virus de la VHS**
- \*transmisión : Horizontal y Vertical sobre los huevos
- \*efectos : Se presenta en formas aguda, crónica y nerviosa los brotes ocurren en todas las edades

## ENFERMEDAD de salmones por HERPESVIRUS

- \*otras denominaciones : OMV
- \*agente : *Herpesvirus salmonis* tipo 2
- \*transmisión : Horizontal y vertical
- \*efectos : La mortalidad varía por especie y edad alevines de un mes. Las mortalidades por especie son: Coho 39%, Truchas 29%, Chinook y Masou 100% (Kimura et al., 1983). El 60% de los sobrevivientes desarrollan tumores (Kimura et al., 1981).

## SINDROME DE LOS CUERPOS DE INCLUSION

- \*agente : virus de la EIBS
- \*transmisión : desconocida
- \*efectos : Afecta a juveniles y peces en esmoltificación. Las epizootias son de larga duración y agudas en presencia de otros patógenos (Thoesen, 1994).

## FURUNCULOSIS

- \*agente : *Aeromonas salmonicida*
- \*transmisión : Horizontal, a través del agua, contacto con portadores, peces silvestres (eventuales reservorios) y equipo o material infectado.
- \*efectos : Mortalidades altas (15 a 20% en Mar) (ANON, 1990). Desarrollan resistencia a la mayoría de los antibióticos permitidos.

## ENFERMEDAD DE HITRA

- \*otras denominaciones : Vibrosis del agua fría
- \*agente : *Vibrio salmonicida*
- \*transmisión : Horizontal
- \*efectos : considerables pérdidas de Salmón Atlántico en Noruega desde los 70's (Inglis et al., 1993)

## EDWARDSIELLOSIS

- \*otras denominaciones : Enfermedad putrefactiva enfisematosa del bagre (EPDC).
- \*agente : *Edwardsiella tarda*
- \*transmisión : Horizontal por contacto con portadores y peces enfermos.
- \*efectos : Mortalidad del 5-50% en bagre de canal (Inglis et al., 1993).

## CERATOMIXOSIS

- \*otras denominaciones : Ceratomixosis de salmónidos.
- \*agente : *Ceratomixa shanta*
- \*transmisión : Desconocida. Geográficamente limitado a zonas del oeste de los Estados Unidos, costa del Pacífico,
- \*efectos : Altas mortalidades en juveniles de agua dulce y reproductores.

Merece atención especial un tercer grupo de enfermedades, que sin haber sido consideradas de alto riesgo por el hecho de ser controlables, se mencionan en este listado por estar presentes en el país y haber causado mortalidades importantes. Tal es el caso de la **Enfermedad de la Boca Roja** cuya presencia está confirmada desde el año 1992 y la **Enfermedad del Agua Fría** informada por algunos laboratorios encuestados en este estudio y en revistas de información y difusión de temas de acuicultura y por haber sido presentado el primer aislamiento (BUSTOS P. 1994) en el "Seminario de Patologías de la Nutrición" organizado por Fundación Chile y realizado en Puerto Montt en Noviembre de 1994. La primera ha sido controlada exitosamente con el uso de vacunas mientras que la segunda resulta difícil de controlar en alevines cuando son incapaces de ingerir alimento con medicamento en ellos, sólo tienen éxito aquellas drogas de rápida absorción por el tejido del pez. En Estados Unidos desde 1988 se está usando vacunas para proteger los peces de esta enfermedad (Inglis et. al, 1993).

## ENFERMEDAD ENTERICA DE LA BOCA ROJA

- \*otras denominaciones : ERM, Yersiniosis, Enfermedad de Hagerman, Enfermedad de la Boca Roja.
- \*agente : *Yersinia ruckeri*
- \*transmisión : horizontal
- \*efectos : forma aguda y subaguda: mortalidades entre 10-50%, forma crónica: bajas mortalidades por períodos prolongados. La forma crónica puede transformarse en aguda después de períodos de estrés.

## ENFERMEDAD DEL AGUA FRIA

- \*otras denominaciones : Enfermedad de bajas temperaturas, Enfermedad del pedúnculo, Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS), Rainbow trout Fry Anemia (RTFA), Fry Mortality Syndrome (FMS), Bacterial Fry Anemia (BFA), Bacterial Cold Water Disease (BCWD) o Myxobacteriosis visceral.
- \*agente : *Flexibacter psychrophilus* (syn: *Cytophaga psychrophila*)
- \*transmisión : horizontal y vertical (cuando los reproductores están altamente infectados) (FRYER, 1989).
- \*efectos : mortalidades hasta 50-60%, en peces juveniles (alevines). Los peces que sobreviven a los brotes pueden desarrollar escoliosis.

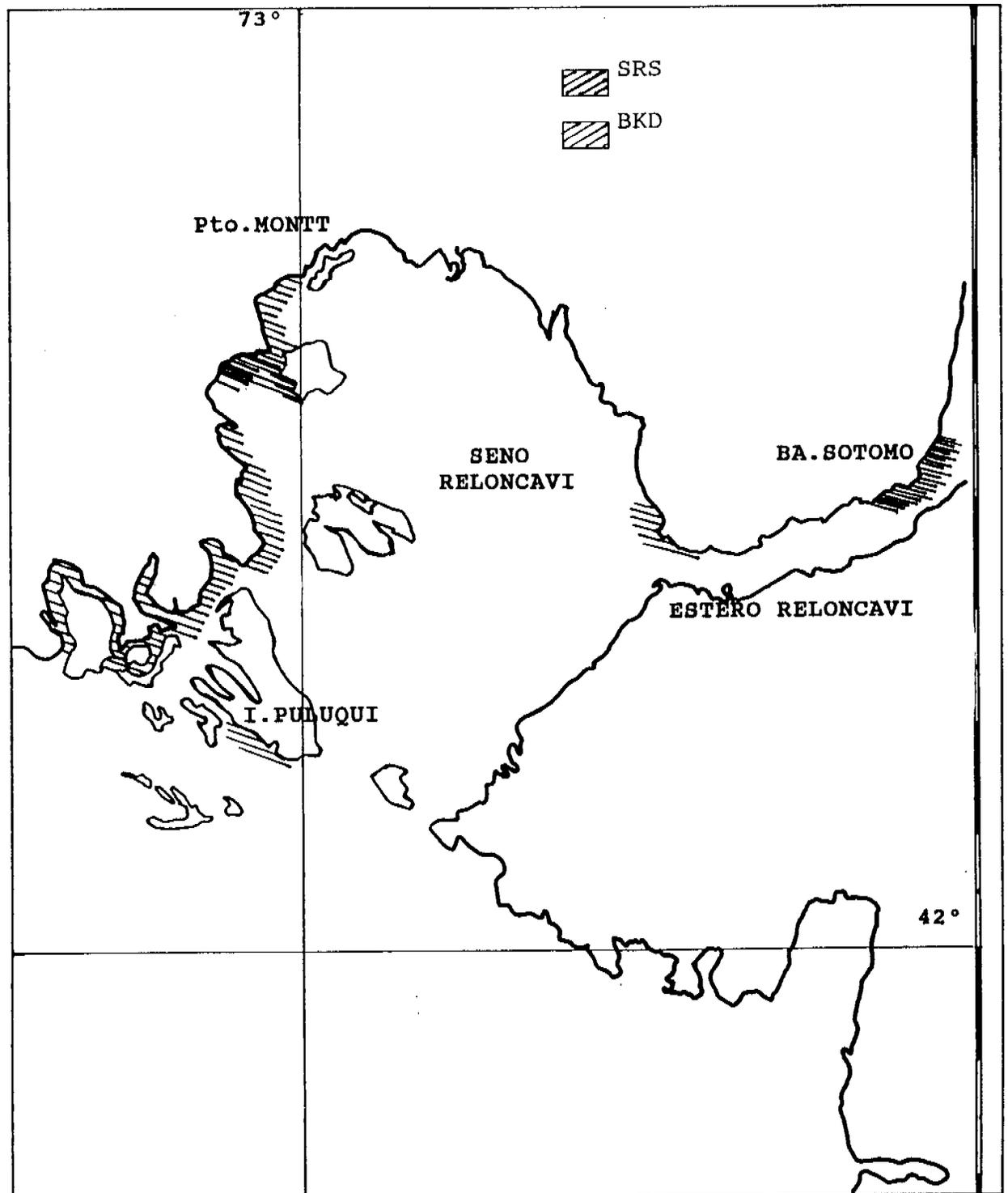
En la actualidad, la presencia en aguas continentales de Chile de enfermedades infectocontagiosas, se limita principalmente a enfermedades micóticas y, en los últimos años, a la presencia de la enfermedad entérica de la boca roja (ERM) o yersiniosis, y otras cuya ocurrencia está muy relacionada con factores de manejo, en general controlables, a excepción de BKD y SRS que a pesar de existir registros, no hay reportes de epizootias. No obstante, no debe olvidarse el permanente riesgo que implica la introducción de nuevas patologías a través de la importación de ovas de países del hemisferio norte.

En los centros de aguas continentales, se registró información de presencia de BKD y SRS. En el caso de BKD se registra para el Lago Llanquihue, Sector Estero Reñihue y Sector Chaitén en la X Región, en Aysen en la XI Región y en el sector de Río Verde en la XII Región. SRS se presentó sólo en la X Región en el Sector Estero Reñihue y Sector Chaitén. En consecuencia, se estima que aparentemente se podría considerar actualmente como zona libre SRS en aguas continentales, las regiones XI y XII. Con respecto a los virus no es posible aventurar zonas libres debido a la inconsistencia de la información entregada por los laboratorios respecto de aquella obtenida de los centros de cultivo.

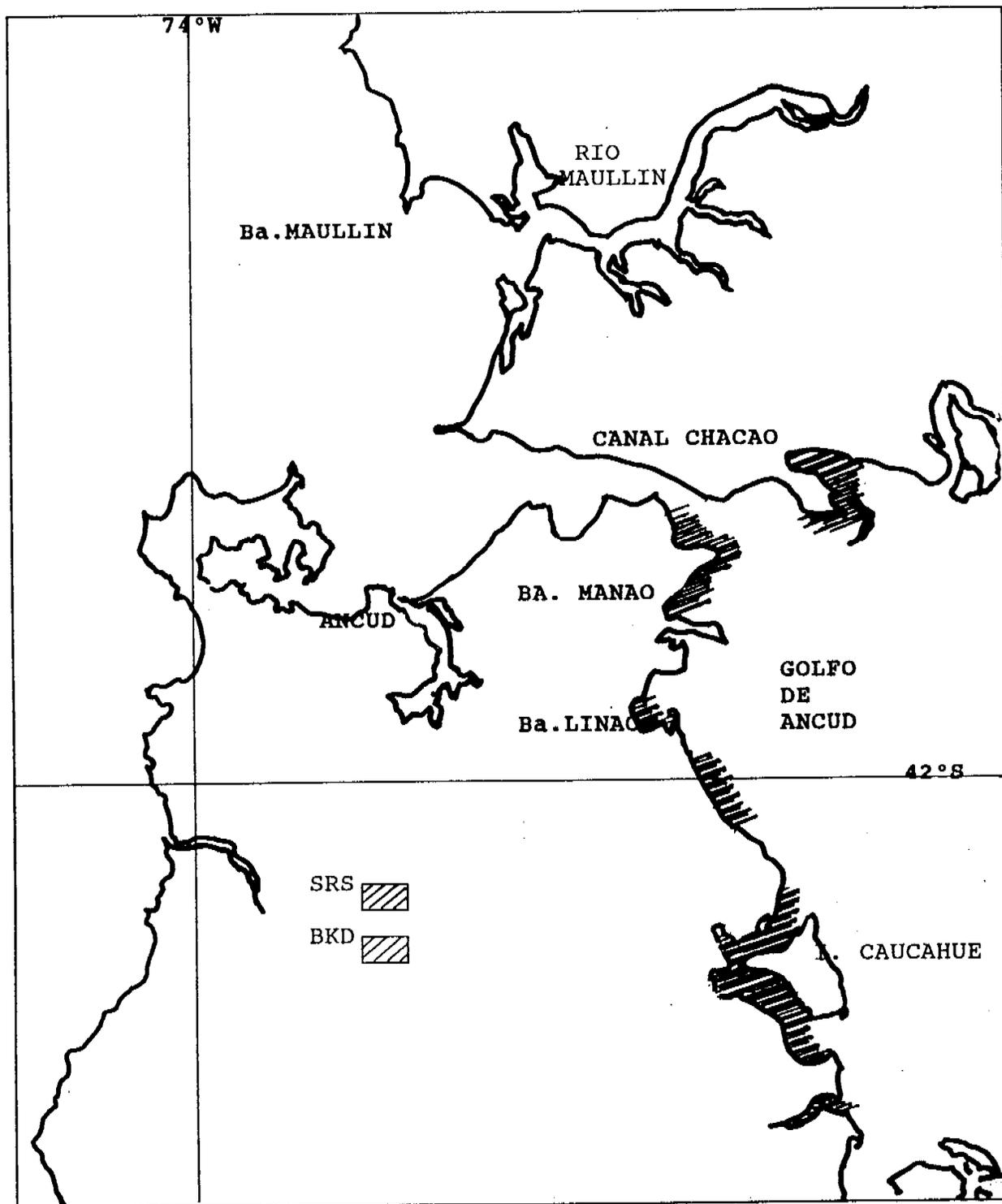
En aguas marinas, los problemas más importantes están representados por enfermedades de origen bacteriano tales como la enfermedad bacteriana del riñón (BKD), y el

MAPA I. SECTOR SENO RELONCAVI.

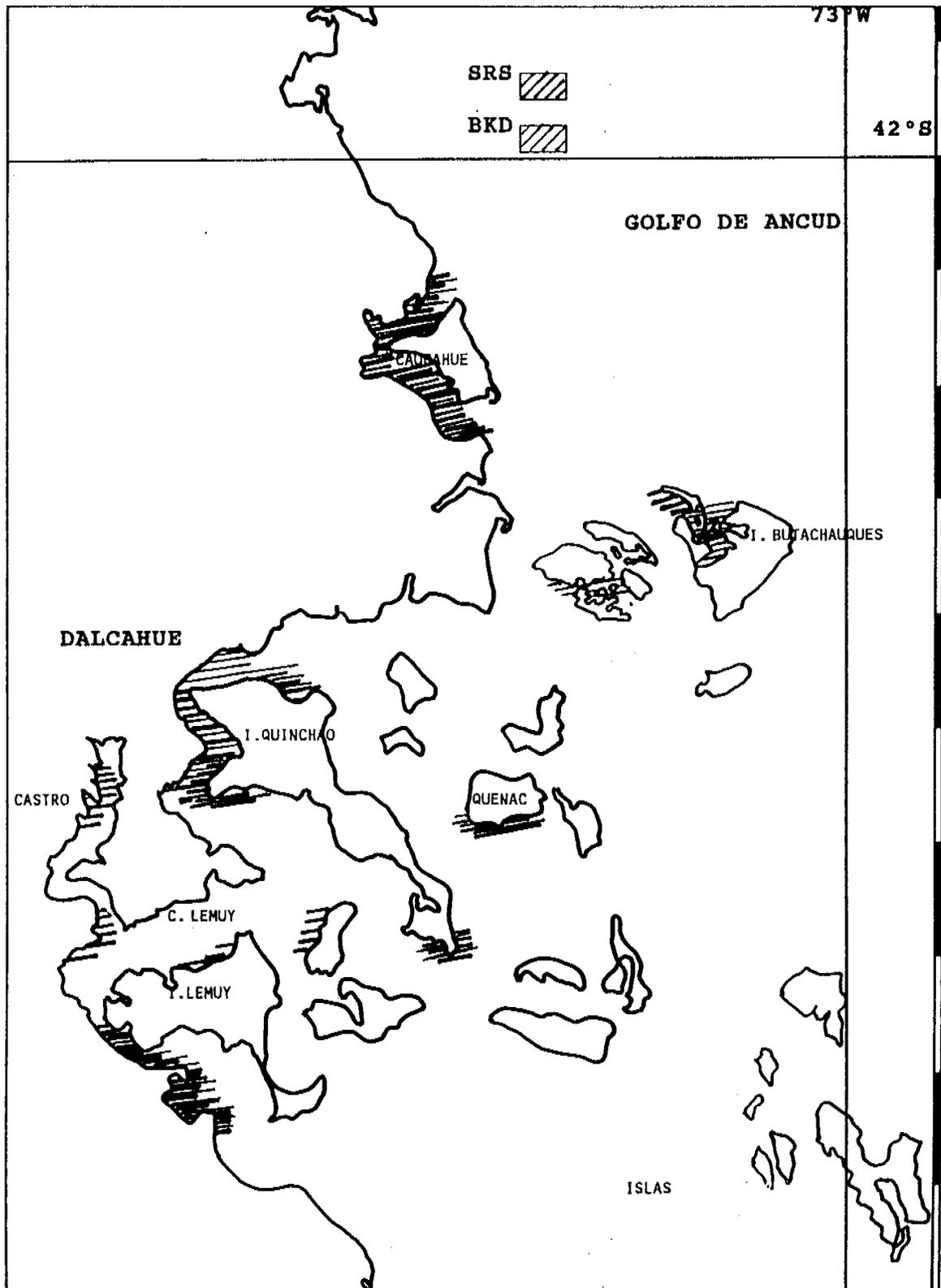
Distribución de SRS y BKD.



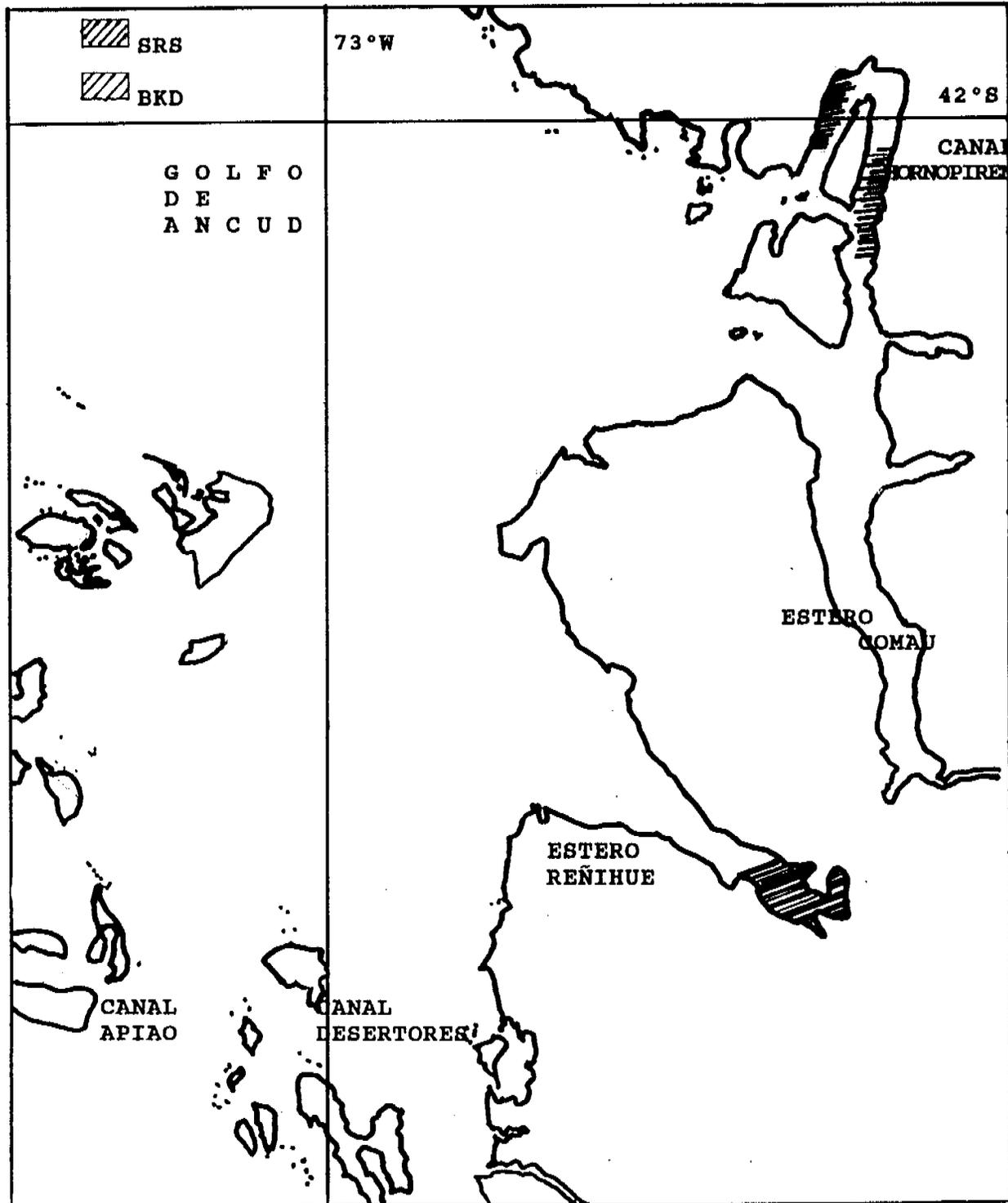
MAPA II. Distribución de SRS y BKD  
SECTOR ANCUD - QUEMCHI



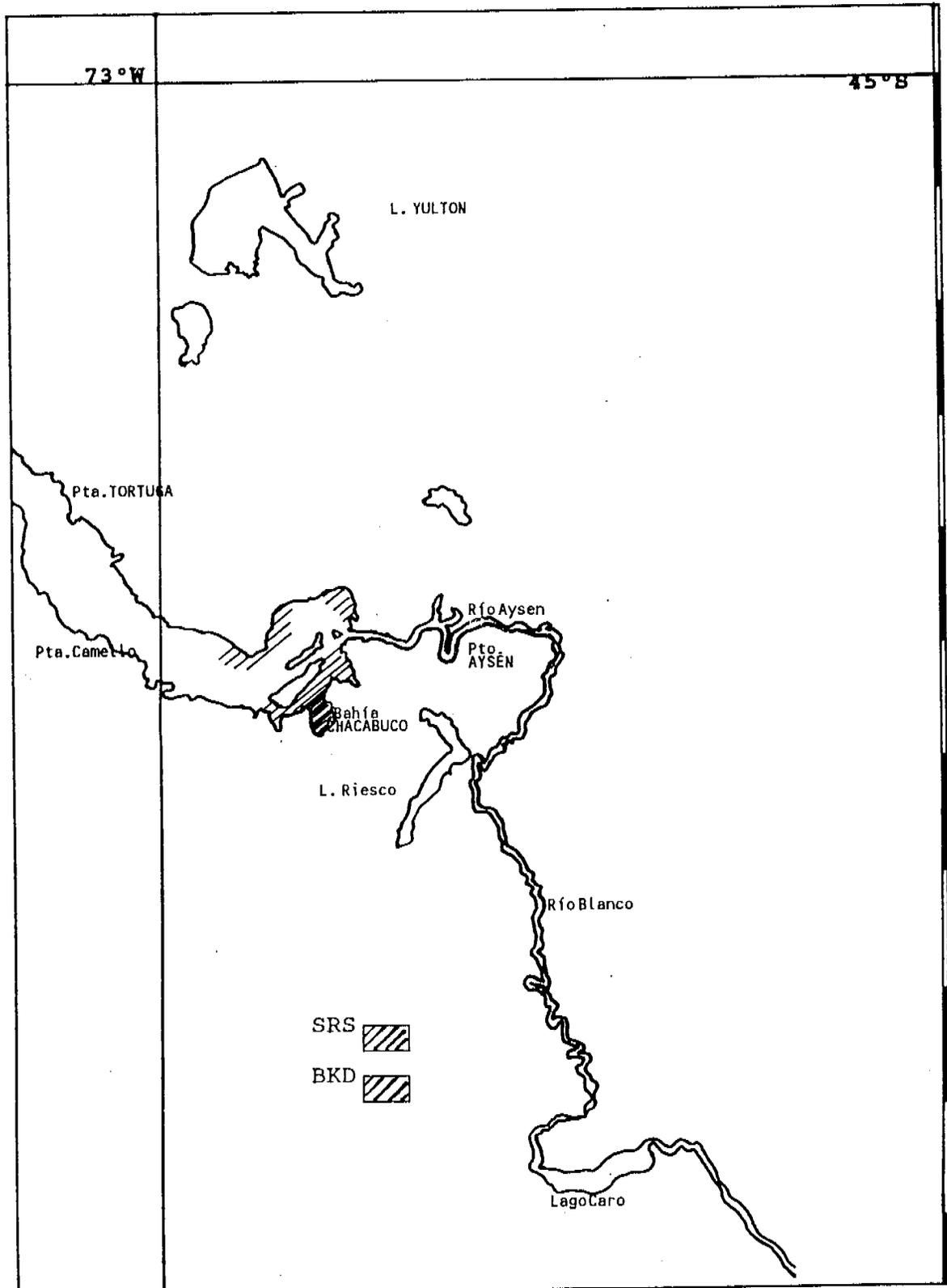
MAPA III. SECTOR DALCAHUE.  
Distribución de SRS y BKD.



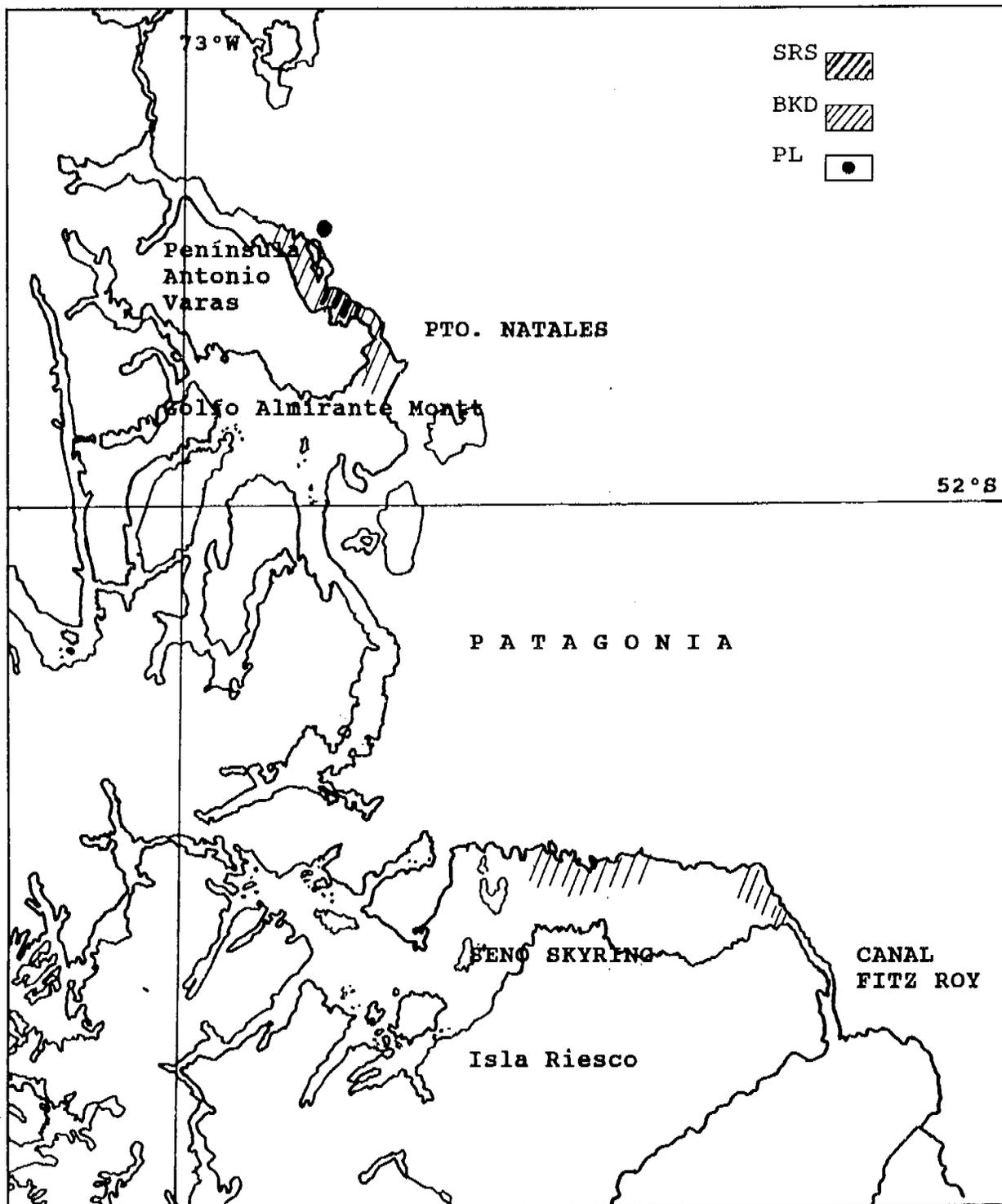
MAPA IV. SECTOR ESTERO COMAU  
DISTRIBUCION DE SRS Y BKD



MAPA V. SECTOR AYSEN  
DISTRIBUCION DE SRS Y BKD



MAPA VI. DISTRIBUCION DE SRS, BKD Y PL.  
SECTOR PATAGONIA - PUERTO NATALES



síndrome rickettsial (SRS). Por otra parte, frecuentemente se han reportado entidades parasitarias, sin embargo, el peligro latente, en este grupo, lo constituyen los endoparásitos protozoarios (microsporidios) que infectan a una gran variedad de animales y viven dentro de las células, cuya presencia se presume en la XI Región, ya que ha sido últimamente detectada por laboratorios de la XI Región, pero no se dispone de información sobre el origen de la muestra. En la Universidad Austral se ha identificado un microsporidio como *Enterocytozoon salmonis*, por medio de microscopía electrónica, sin indicación de la procedencia de la muestra.

En el caso de los centros de agua de mar, la X Región se dividió en los siguientes sectores geográficos: Sector Seno Reloncaví (Mapa I), Sector Ancud-Quemchi (Mapa II), Sector Dalcahue (Mapa III), y Sector Estero Comau (Mapa IV). La XI Región se denominó Sector Aysén (Mapa V) y la XII Región, Sector Patagonia-Puerto Natales (Mapa VI).

Del análisis de los mapas indicados, se puede decir que no hay regiones libres de BKD, y que esta patología parece estar fuertemente asociada a la aparición de SRS. Esta última, ampliamente distribuída por toda la décima región, ha sido informada a partir de 1993 en la XI Región (Puerto Chacabuco), y recientemente en la XII región en la zona del canal Señoret. Sin embargo, se hace notar que en este último caso no hay información de las mortalidades asociadas. Esta situación podría llevar a la conclusión que no hay regiones libres de SRS en el mar. La única información de la presencia de virus, se obtuvo de la XII región (Mapa VI). Este registro del virus (PL), no obstante, no parece ser el primer caso dado que la mayoría de los laboratorios lo ha identificado. Sin embargo, no se ha encontrado publicaciones científicas que corroboren su presencia.

Finalmente, cabe señalar que sólo una vez que el sistema de vigilancia proporcione datos más detallados de patologías por zonas o áreas, se podrá determinar zonas libres de ciertos patógenos. No obstante, se estima que el registro de información de al menos dos años de ausencia de una patología permitiría declarar una zona o área libre del patógeno en cuestión.

## DISEÑO DE UN PROGRAMA DE VIGILANCIA Y DETECCIÓN PRECOZ DE ENFERMEDADES DE MAYOR PREVALENCIA

La Organización Mundial de la Salud ha definido que: "Vigilancia epidemiológica nacional y mundial de las enfermedades transmisibles, es el escrutinio permanente y la observación activa de la distribución y propagación de las infecciones y factores relacionados con suficiente exactitud en calidad y cantidad para ser pertinentes para un control eficaz".

Un sistema eficiente de vigilancia es de gran valor debido a que proporciona un mecanismo de defensa mediante la rápida detección de la presencia de enfermedades enzoóticas como así también de las exóticas. También es factible utilizar el sistema de vigilancia como una parte de gran influencia en los programas de control y erradicación (D.W. Broadbent, 1992). En vista a que el país está considerando la implementación de sistemas de vigilancia en orden a controlar o erradicar patologías de salmónidos de cultivo, necesita información confiable y actualizada sobre la estructura de la industria en cuestión, la incidencia de las enfermedades sobre las cuales se desea actuar, los factores económicos y la epidemiología de las enfermedades. Un sistema de vigilancia tendría que implementar una infraestructura que permita realizar las actividades correspondientes y que tienen los siguientes objetivos fundamentales:

- A. Evitar la entrada de enfermedades.
- B. Detectar la enfermedad en caso de introducción.
- C. Apoyar las medidas de control y erradicación.

La implementación del sistema de vigilancia requiere de una serie de actividades que pueden agruparse en la siguiente forma:

1. Recolección sistemática de datos pertinentes.
2. Consolidación, evaluación e interpretación de los datos.
3. Recomendación de las medidas adecuadas que haya que tomar.
4. Pronta distribución de la Información y de las recomendaciones a los involucrados, en especial a los que deben decidir y actuar.

Los riesgos ictiosanitarios, en el caso de los peces cultivados en fase de agua dulce, son de características diferentes a los cultivos en fase marina, principalmente porque constituyen la vía de entrada de agentes patógenos exóticos. Así, la estructuración de un sistema de vigilancia, tiende a:

- Detectar la entrada de agentes exógenos mediante un programa de monitoreo que se inicia con la llegada de las ovas al centro de cultivo,
- Recepcionar información sobre mortalidades anormales no explicables.
- Detectar variaciones en los parámetros ambientales que influyen en el desarrollo de las enfermedades y establecer los rangos de riesgo.
- Contemplar un plan de acciones destinado a evitar la diseminación de patógenos peligrosos y controlarlos con medidas drásticas que deben informarse a través de un sistema eficiente de comunicación.
- Detectar precozmente, en el sistema marino, las enfermedades clasificadas como de alto riesgo en el objetivo No.1.
- Mantener un sistema de información periódica de patologías a partir de la llegada de los smolts al centro.
- Obtener información complementaria en el caso de centros que comparten cuerpos de agua adyacentes, para determinar la dimensión del foco infeccioso
- Mantener registros periódicos de las variables ambientales críticas para el desarrollo de las patologías, estableciendo los respectivos rangos de riesgo.
- Establecer un plan de acción para la toma de medidas de control en tiempo mínimo.

## Creación del Prototipo Computacional

Para obtener una base de datos que permita sustentar en forma eficaz la información a recopilar y así poder emitir información adecuada, existe el método de Modelamiento de Datos. Este método permite obtener mediante una serie de pasos sistemáticos la base de datos conceptual que luego será soportada por algún administrador de bases de datos.

Los pasos del método son:

- 1.- **Formulación de requerimientos**, cuyo propósito es identificar y describir los datos requeridos. Los datos son identificados mediante entrevistas con el cliente, o información del entorno.
- 2.- **Diseño conceptual**, cuyo propósito es definir las vistas de los usuarios<sup>1</sup>, y los requerimientos de información de un diseño global de la base de datos. Se definen las entidades, los atributos y las relaciones.
- 3.- **Implementación del diseño**, donde se mapea el modelo conceptual a un modelo interno o esquema que pueda ser procesado por un Sistema Administrador de Base de Datos.
- 4.- **Diseño físico**, que especifica, entre otras cosas, los formatos de los registros y la selección de los métodos de acceso.

A continuación, se muestra, en forma sumaria, el método y su aplicación a esta problemática.

---

<sup>1</sup> Visión de un subconjunto de datos de la base de datos.

## 1 Formulación de Requerimientos.

Dada la necesidad de construir un sistema de vigilancia para la rápida detección de la presencia de enfermedades de salmónidos de cultivo, es necesaria la participación de expertos en el tema, así como personas que realicen la labor de capturadores de requerimientos.

En el caso de este sistema, se enfrenta una situación que no ha sido modelada anteriormente, lo que es una dificultad más para la aplicación del método.

En la recolección de los datos, se concurre normalmente a documentos oficiales o entrevistas (vistas de usuario) de los cuales se puede obtener posteriormente las entidades (archivos).

En este caso, la recolección de datos se abocó a entrevistas a especialistas de las diversas áreas del conocimiento involucradas en el proyecto.

En forma básica, se puede decir que el sistema se compone de cuatro grandes procesos de trabajo:

- a) Ingreso formulario de encuestas.
- b) Muestreo
- c) Reportes
- d) Mantención archivos principales.

### **Proceso a)**

Cuando el sistema opera en el caso de normalidad, se envían encuestas a los centros. Estas encuestas fueron desarrolladas por el grupo de trabajo.

Para cada centro se diseñaron dos encuestas orientadas una a ser respondida por el centro <sup>49</sup>y para ser respondida por un

laboratorio. En el caso del centro fluvial, que mantiene Ovas y Alevines, cabe la posibilidad de enviar dos diferentes tipos de encuestas, por etapa del salmónido.

Cada encuesta corresponde a un lote (grupo de la misma especie y edad, asignada a una población de productores y que comparten un mismo suministro de agua).

#### **Proceso b)**

Para esta parte, se realiza un muestreo aleatorio simple, el que depende del tipo de caso, ya sea éste, normalidad o alerta amarilla.

En el caso de normalidad, se especifica un nivel de confianza, la precisión y la estimación adelantada.

#### **Proceso c)**

Mediante este requerimiento se pueden emitir reportes históricos de centros que han tenido una alerta amarilla y otro reporte de centros con alertas.

#### **Proceso d)**

Mediante este requerimiento se podrán ingresar, alterar, eliminar, imprimir los datos principales para las empresas, sus centros de cultivos asociados, los centros productores de ovas, los laboratorios, las especies de salmónidos y los agentes que influyen en los porcentajes de determinación de las alertas por región.

## 2 Diseño conceptual.

### 2.1.- Encuestas para centro fluvial

Para este tipo de centro, es necesario saber la posibilidad de una enfermedad para los peces en etapa de ovas y en etapa de alevines.

Las entrevistas realizadas indican la necesidad de dos tipos de encuestas para cada tipo de etapa del salmónido. En el caso de ovas, el centro seleccionado debe contestar una encuesta (figura 1) y pedir a un laboratorio de su preferencia responder la parte pertinente (figura 3), para luego enviar ambas respuestas al remitente.

En el caso de alevines, la situación es similar. Aunque en este caso, el formulario para el centro es distinto (figura 2) y lo mismo ocurre para el laboratorio (figura 4).

En resumen, hay cuatro vistas asociadas a cada centro fluvial seleccionado (figuras 1, 2, 3 y 4) que permiten modelar las entidades involucradas en estas.

Figura 1  
 Vista 1: Encuesta ovas, centro fluvial.

**Encuesta de Ovas Centro Fluvial**

---

Empresa  Especie   
 Centro de Cultivo  Fecha de Ingreso   
 Proveedor  Fecha Encuesta   
 Total Ovas  Código Lote

---

**Historia Sanitaria de los Padres**

Diagnóstico por Muestreo       Diagnóstico Padre a Padre  
 - Patógenos analizados o Certificados libres de ...

<input type="checkbox"/> IPNV	<input type="checkbox"/> Retrovirus salmonis Tipo1
<input type="checkbox"/> VHSV	<input type="checkbox"/> Retrovirus salmonis Tipo 2
<input type="checkbox"/> IHNV	<input type="checkbox"/> Retrovirus PL
<input type="checkbox"/> Virus de la EIHS	<input type="checkbox"/> Otros agentes virales
<input type="checkbox"/> Renibacterium salmoninarum	<input type="checkbox"/> Yersinia ruckeri
<input type="checkbox"/> Piscirickettsia salmonis	<input type="checkbox"/> Flexibacter psychrophilus
<input type="checkbox"/> Aeromonas salmonicida	<input type="checkbox"/> Otros agentes bacterianos
<input type="checkbox"/> Ceratomyxa shasta	<input type="checkbox"/> Otros agentes infecciosos

---

**Tratamiento previos al desove**  
 Inyección de Antibióticos  
 10 días  
 10 a 30 días      Antes del Desove  
 30 o más días

**Test utilizados**  
 Efecto citopático  
 Elisa  
 PCR  
 IFAT  
 Otros

---

**Historia de las Ovas**

**Mortalidad**  
 Total al Periodo de Eclósión  %

- Transporte	<input type="checkbox"/>	X
- Hongos	<input type="checkbox"/>	X
- Bacterias	<input type="checkbox"/>	X
- Ambiente	<input type="checkbox"/>	X
- Otros	<input type="checkbox"/>	X

**Tratamiento de las Ovas**  
 - Preventivos  Desinfección  
 - Curativos  Antibióticos  
 Solución Salina  
 Verde Malaquita  
 Otros

Especificar

---

**Otros**

Temperatura	7	6	5	4	3	2	1
Máxima							
Mínima							

Última Inspección Sanitaria

**Figura 2**  
**Vista 2: Encuesta alevines, centro fluvial.**

Encuesta Alevines Centro Fluvial

Empresa	<input type="text"/>	Fecha Encuesta	<input type="text"/>
Nombre Centro	<input type="text"/>	Total Alevines	<input type="text"/>
Especie	<input type="text"/>	Código Lote	<input type="text"/>
Fecha Ingreso Lote	<input type="text"/>		

- Como Ova  
 Como Alevín

- Datos de los Alevines -

<b>Mortalidad</b>		<b>Signos Del Comportamiento</b>	<b>Signos Externos</b>
A la Primera Alimentación	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Letargia/Apatía	<input type="checkbox"/> Tercio Posterior Oscuro
Al Momento del Traslado	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Natación Errática	<input type="checkbox"/> Aletas Destalochadas
Al Término del Alevinaje	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Natación en Tirabuzón	<input type="checkbox"/> Manchas Rojas Altura del Riñón
		<input type="checkbox"/> Inapetencia	<input type="checkbox"/> Zonas Blanquecinas
		<input type="checkbox"/> Boqueo	<input type="checkbox"/> Sobreproducción de mucus
		Otros: <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Cabeza de Alfiler
			Otros: <input type="text"/>

<b>Droga Utilizada</b>	<b>Fecha</b>	<input type="text"/>		
	<b>Numero de Veces</b>	<b>mg por kilo de pez por día</b>	<b>Numero de Veces</b>	<b>mg por kilo de pez por día</b>
Macrólidos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Tetraciclinas	<input type="text"/>
Nitrofuranos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Sulfamidas	<input type="text"/>
Quinolonas	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Sulfamidas Asociadas	<input type="text"/>

<b>Sustancias Químicas Utilizadas</b>	<b>Fecha</b>	<input type="text"/>		
	<b>Numero de Veces</b>	<b>Partes Por Millón</b>	<b>Numero de Veces</b>	<b>Partes Por Millón</b>
Ac. Acético	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Furazolidona	<input type="text"/>
Sodio	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Niclosamida	<input type="text"/>
Dibromuro de Diquat	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Permanganato de Potasio	<input type="text"/>
Formol	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Verde Malaquita	<input type="text"/>

Otros

Temperatura	1	2	3	4	5	6	7
Máxima							
Mínima							

Última Inspección Sanitaria

Figura 3  
 Vista 3: Encuesta para Laboratorio de Ovas.

**Encuesta Laboratorio Ovas**

**Datos del Centro y Examen**

Fecha de la Encuesta

Empresa

Centro de Cultivo

Especie

Tipo de Centro

Código Lote

**Virus:**

IPNV  Retrovirus salmonis tipo 1

VHSV  Retrovirus salmonis

IHNV  Retrovirus de la PL

Virus de la EIBS   Otros Agentes Virales

**Bacterias:**

Renibacterium salmoninarum

Piscirickettsia salmonis

Aeromonas salmonicida

Flexibacter psychrophilus

Otros Agentes Bacterianos

Figura 4  
 Vista 4: Encuesta para Laboratorio de Alevines.

**Encuesta Laboratorio Alevines**

**Datos del Centro y Examen**

Fecha de la Encuesta

Empresa

Centro de Cultivo

Especie

Tipo de Centro

Código Lote

**Virus:**

IPNV   Retrovirus salmonis tipo 1

VHSV   Retrovirus salmonis tipo 2

IHNV   Retrovirus de la PL

Virus de la EIBS    Otros Agentes Virales

**Bacterias:**

Renibacterium salmoninarum   Yersinia ruckeri

Piscirickettsia salmonis   Flexibacter psychrophilus

Aeromonas salmonicida   Ceratomyxa shasta

Vibrio salmonicida    Otros Agentes Bacterianos

Edwardsiella tarda

## 2.2.- Encuestas para Centro Lacustre

Para este tipo de centro, es necesario saber la posibilidad de una enfermedad para los peces en categoría pre-smolt.

Las entrevistas indican la necesidad de dos tipos de encuestas, una orientada al centro seleccionado (figura 5) y otra encuesta que el centro debe derivar a un laboratorio de su preferencia para luego devolverlas al remitente (figura 6).

Las vistas relacionadas son, por lo tanto, dos (vistas 5 y 6) y éstas permiten modelar las entidades asociadas.

**Figura 5**  
**Vista 5: Encuesta pre-smolt, centro lacustre.**

**Encuesta Pre-Smolt Centro Fluvial**

**Datos del Centro y Lote**

Empresa	<input type="text"/>	Fecha Encuesta	<input type="text"/>
Centro de Cultivo	<input type="text"/>	Fecha Ingreso	<input type="text"/>
Especie	<input type="text"/>	Código Lote	<input type="text"/>
Proveedor del pre-smolt	<input type="text"/>		
Número de jaulas del Lote	<input type="text"/>		
Peso promedio individual	<input type="text"/>		

**Droga Utilizada** Fecha

	Número de Veces	mg por kilo de pez por día		Número de Veces	mg por kilo de pez por día
Macrólidos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Tetraciclinas	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nitrofuranos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Sulfamidas	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Quinolonas	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Sulfamidas Asociadas	<input type="text"/>	<input type="text"/>

**Sustancias Químicas Utilizadas** Fecha

	Número de Veces	Partes por Millon		Número de Veces	Partes por Millon
Ac. Acético	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Furazolidona	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Sodio	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Niclosamida	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Dibromuro de Diquat	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Permanganato de Potasio	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Formol	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Verde Malaquita	<input type="text"/>	<input type="text"/>

**- Datos de los Pre-smolt**

Mortalidad por lote Transporte % A la fecha Actual %

Síntomas Observados Durante la última semana

<input type="checkbox"/> Letargia/Apatía	<input type="checkbox"/> Coloración oscura	<input type="checkbox"/> Boca Roja
<input type="checkbox"/> Peces orillando	<input type="checkbox"/> Ulceras y llagas visibles	<input type="checkbox"/> Pérdidas de escamas
<input type="checkbox"/> Inapetencia	<input type="checkbox"/> Aletas deshinchadas	<input type="checkbox"/> Hinchazón lateral
<input type="checkbox"/> Pérdida de Equilibrio	<input type="checkbox"/> Ano rojo	<input type="checkbox"/> Manchas blancas
<input type="checkbox"/> Peces Erráticos		

Mortalidad diaria							Transparencia del agua (metros de visibilidad)						
7	6	5	4	3	2	1	7	6	5	4	3	2	1
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>							

**Temperatura últimos siete días**

Temperatura	7	6	5	4	3	2	1
Mañana	<input type="text"/>						
Mediodía	<input type="text"/>						
Tarde	<input type="text"/>						
Promedio	<input type="text"/>						

**Figura 6**  
**Vista 6: Encuesta para laboratorio de Pre-Smolt.**

Encuesta Laboratorios Pre-Smolt

Datos del Centro y Examen			
Fecha de la Encuesta	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Empresa	<input type="text"/>		
Centro de Crivo	<input type="text"/>		
Especie	<input type="text"/>		
Tipo de Centro	<input type="text"/>		
Código Lote	<input type="text"/>		
Virus:			
IPNV	<input type="checkbox"/>	X	Retrovirus salmonis tipo 1 <input type="checkbox"/>
VHSV	<input type="checkbox"/>	X	Retrovirus salmonis <input type="checkbox"/>
IHNV	<input type="checkbox"/>	X	Retrovirus de la PL <input type="checkbox"/>
Virus de la EIBS	<input type="checkbox"/>	X	<input type="checkbox"/> Otros Agentes Virales
			<input type="text"/> <input type="checkbox"/>
Bacterias:			
Renibacterium salmoninarum	<input type="checkbox"/>	X	
Piscirickettsia salmonis	<input type="checkbox"/>	X	Yersinia ruckeri <input type="checkbox"/>
Aeromonas salmonicida	<input type="checkbox"/>	X	Flexibacter psychrophilus <input type="checkbox"/>
Vibrio salmonicida	<input type="checkbox"/>	X	Ceratomyxa shasta <input type="checkbox"/>
Edwardsiella tarda	<input type="checkbox"/>	X	<input type="checkbox"/> Otros

**2.3.- Encuestas para Centro Marítimo**

Para este tipo de centro, es necesario saber la posibilidad de una enfermedad para los peces en etapa de smolt. Las entrevistas indican la necesidad de dos tipos de encuestas para esta etapa del salmónido, una está orientada al centro seleccionado (figura 7) y otra que el centro debe derivar a un laboratorio de su preferencia para luego devolverlas al remitente (figura 8). Las vistas relacionadas son, por lo tanto, dos (vistas 7 y 8) y éstas permiten modelar las entidades asociadas.

Figura 7  
 Vista 7: Encuesta smolt, centro marítimo.

**Encuesta Smolt Centros Marítimos**

---

**Datos del Centro y Lote**

Empresa	<input type="text"/>	Fecha de la Encuesta	<input type="text"/>
Centro de Cultivo	<input type="text"/>	Fecha de Ingreso del Lote	<input type="text"/>
Especie	<input type="text"/>	Código Lote	<input type="text"/>
Proveedor del Smolt	<input type="text"/>		
Número de jaulas del Lote	<input type="text"/>		
Peso promedio individual	<input type="text"/>		

---

**Datos de los Smolt**

Mortalidad por lote      Transporte %      A la fecha Actual %

Síntomas Observados Durante la última semana

<input type="checkbox"/> Letargia/Apatía	<input type="checkbox"/> Coloración oscura	<input type="checkbox"/> Boca Roja
<input type="checkbox"/> Peces orillando	<input type="checkbox"/> Ulceras y llagas visibles	<input type="checkbox"/> Pérdidas de escamas
<input type="checkbox"/> Inapetencia	<input type="checkbox"/> Aletas deshilachadas	<input type="checkbox"/> Hinchazón lateral
<input type="checkbox"/> Pérdida de Equilibrio	<input type="checkbox"/> Ano rojo	<input type="checkbox"/> Manchas blancas
<input type="checkbox"/> Peces Erráticos	<input type="checkbox"/> Cataratas	<input type="checkbox"/> Exoftalmia
		<input type="checkbox"/> Petequias Ventrales

---

**Droga Utilizada**      Fecha

	Número de veces	mg por kilo de pez por día		Número de veces	mg por kilo de pez por día
Macrólidos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Tetraciclinas	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nitrofuranos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Sulfamidas	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Quinolonas	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Sulfamidas Asociadas	<input type="text"/>	<input type="text"/>

---

**Sustancias Químicas Utilizadas**      Fecha

	Número de veces	Partes por millón		Número de veces	Partes por millón
Ac. Acético	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Furazolidona	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Cloruro de Sodio	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Niclosamida	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Dibromuro de Diquat	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Permanganato de Potasio	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Formol	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Verde Malaquita	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Figura 8  
Vista 8: Encuesta laboratorio para Smolt.

**Encuesta Laboratorio Smolt**

**Datos del Centro y Examen**

Fecha de la Encuesta

Empresa

Centro de Cultivo

Especie

Tipo de Centro

Código Lote

Patógenos detectados :

IPNV   Retrovirus PL

IHNV    Otros agentes Virales

Renibacterium salmoninarum   Vibrio salmonicida

Piscirickettsia salmonis    Otros agentes bacterianos

## 2.4.- Vistas para proceso c.

Para realizar el proceso c, las entrevistas dieron como resultados las siguientes vistas:

### Figura 8

Vista 8: Datos necesarios para una empresa (casa matriz)

---

Casa Matriz

nombre  
rut  
dirección  
responsable  
teléfono principal  
fax  
frecuencia radial  
(teléfonos secundarios, descripción teléfonos secundarios)

---

### Figura 9

Vista 9: Datos necesarios para un centro de cultivo

---

Centro de Cultivo (dependiente de una casa matriz)

nombre  
dirección  
responsable  
teléfono principal  
fax  
frecuencia radial  
tipo de centro (fluvial/lacustre/marítimo)  
georreferencia (latitud, longitud)  
región  
ubicación (descripción narrativa del acceso a éste)

---

### Figura 10

Vista 10: Datos necesarios para un centro productor de ovas

---

Centro productor de ovas

nombre  
dirección  
país  
ovas infectadas alguna vez anterior (SI/NO)

---

### Figura 11

Vista 11: Datos necesarios para un laboratorio

---

Laboratorio

nombre  
rut  
dirección  
teléfono  
fax  
tipo de análisis (viral/bacterial)

---

Figura 13  
Vista 13: Datos necesarios para Especies.

---

Especies	
Nombre común	Nombre científico

---

Figura 14  
Vista 14: Datos necesarios para Agentes.

---

Agentes
Virus de la IPN región x
Virus de la IPN región xi
Virus de la IPN región xii
Virus de la IHN región x
Virus de la IHN región xi
Virus de la IHN región xii
Retrovirus PL región x
Retrovirus PL región xi
Retrovirus PL región xii
Virus de la VHS región x
Virus de la VHS región xi
Virus de la VHS región xii
Herpervirus salmonis Tipo 1 región x
Herpervirus salmonis Tipo 1 región xi
Herpervirus salmonis Tipo 1 región xii
Herpervirus salmonis Tipo 2 región x
Herpervirus salmonis Tipo 2 región xi
Herpervirus salmonis Tipo 2 región xii
Renibacterium salmoninarum región x
Renibacterium salmoninarum región xi
Renibacterium salmoninarum región xii
Piscirickettsia salmonis región x
Piscirickettsia salmonis región xi
Piscirickettsia salmonis región xii
Aeromonas salmonicida región x
Aeromonas salmonicida región xi
Aeromonas salmonicida región xii
Vibrio salmonicida región x
Vibrio salmonicida región xi
Vibrio salmonicida región xii
Edwardsiella tarda región x
Edwardsiella tarda región xi
Edwardsiella tarda región xii
Yersinia ruckeri región x
Yersinia ruckeri región xi
Yersinia ruckeri región xii
Flexibacter psychrophilus región x
Flexibacter psychrophilus región xi
Flexibacter psychrophilus región xii
Ceratomyxa shasta región x
Ceratomyxa shasta región xi
Ceratomyxa shasta región xii

---

## 2.5.- Dependencias semánticas e integración de vistas.

Una vez obtenidas las vistas, se debe agrega información semántica acerca de cuáles atributos de las vistas están en directa dependencia de otros atributos de la misma vista.

Se puede indicar que para las vistas 10, 11, 12, 13 y 14, están a lo menos en tercera forma normal, por lo que no es necesario integrarlas.

La vista 9 presenta un rasgo de no-atOMICIDAD al tener la posibilidad de repeticiones del atributo "teléfonos secundarios" y "descripción teléfonos secundarios", al particionar esta vista en dos tablas separando los atributos, quedan ambas tablas en tercera forma normal.

Las vistas 4 y 6 son idénticas por lo que se integran en una sola vista, pero, considerando que es un prototipo sujeto a modificación ulterior, es conveniente dejar separadas ambas vistas en sendas tablas.

Las vistas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, con la información semántica que se dispone, están en tercera forma normal.

Una vez completada la fase de examinación de las vistas y analizadas las dependencias funcionales de los atributos de ellas, se procede a la integración de estas vistas.

De este proceso a las vistas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8, se procede a eliminar el atributo I.3 debido a que un centro de cultivo pertenece solamente a una empresa, y este atributo ya está determinado.

## 2.6.- Modelo de datos conceptual

Luego de realizada la integración de las vistas estas quedan de la siguiente forma:

Para la vista 1:

Vista 1 (Fecha\_encuesta, Centro\_cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, Proveedor\_ova, Total\_ovas,  
Diagnóstico\_muestreo, Diagnóstico\_padre\_a\_padre,  
Patógeno\_IPVN, Patógeno\_VHSV, Patógeno\_IHVN,  
Patógeno\_Virus de la EIBS  
Patógeno\_Herpesvirus Salmonis tipo 1  
Patógeno\_Herpesvirus Salmonis tipo 2, Patógeno\_Retrovirus\_PL,  
Patógeno\_otros\_agentes\_virales,  
Patógeno\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Patógeno\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Patógeno\_Aeromonas\_salmonicida, Patógeno\_Yersinia\_ruckeri,  
Patógeno\_Flexibacter\_psychrophilus,  
Patógeno\_otros\_agentes\_bacterianos,

Patógeno\_Ceratomyxa\_shasta,  
Patógeno\_otros\_agentes\_infecciosos,  
Test\_Efecto citopático, Test\_Elisa, Test\_PCR, Test\_IFAT,  
Test\_Otros, Inyección de antibióticos, Mortalidad,  
Transporte, Hongos, Bacterias, Ambiente, Otros,  
Desinfección, Antibióticos, Solución salina,  
Verde-malaquita, Otros, temp\_max\_7, temp\_min\_7, temp\_max\_6,  
temp\_min\_6, temp\_max\_5, temp\_min\_5, temp\_max\_4, temp\_min\_4,  
temp\_max\_3, temp\_min\_3, temp\_max\_2, temp\_min\_2, temp\_max\_1,  
temp\_min\_1, Inspección\_sanitaria)

Vista 1a (Inyección de antibióticos, días\_antes)

Para la vista 2:

Vista 2 (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, como\_ova, como\_alevín,  
Proveedor\_alevín, Total\_alevines,  
Mortalidad\_primera\_alimentación, mortalidad\_momento\_traslado  
mortalidad\_término\_alevinaje, Letargia/Apatía,  
Natación\_errática, Natación\_tirabuzón, Inapetencia,  
Boqueo, Otros, Tercio\_posterior\_oscuro,  
Aletas\_deshilachadas, Manchas\_rojas\_riñón,  
Zonas\_blanquecinas, velo\_azul, Cabeza\_alfiler, Otros  
Fecha\_droga, Droga\_Macrólidos, Droga\_Nitrofuranos  
Droga\_Quilinas, Droga\_Tetraciclinas, Droga\_Sulfamidas  
Droga\_Sulfamidas\_asociadas, Fecha, Sustancia\_química  
Sustancia\_química\_ácido\_acético,  
Sustancia\_química\_Cloruro de Sodio,  
Sustancia\_química\_Dibromuro de Diquat,  
Sustancia\_química\_Formol, Sustancia\_química\_Furazolidona,  
Sustancia\_química\_Niclosamida,  
Sustancia\_química\_Permanganato\_de\_potasio,  
Sustancia\_química\_Verde\_malaquita,  
temp\_max\_7, temp\_min\_7, temp\_max\_6, temp\_min\_6, temp\_max\_5,  
temp\_min\_5, temp\_max\_4, temp\_min\_4, temp\_max\_3, temp\_min\_3,  
temp\_max\_2, temp\_min\_2, temp\_max\_1, temp\_min\_1,  
Inspección\_sanitaria)

Para la vista 3:

Vista 3 (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie, Código\_lote,  
Virus, Aeromonas\_salmonicida, Yersinia\_ruckeri,  
Virus\_IPNV, Virus\_VHSV, Virus\_IHNV, Virus\_de\_la\_EIBS,  
Virus\_Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1, Patógeno\_Herpesvirus\_Salmonis tipo 2,  
Virus\_Retrovirus\_PL, Otros\_agentes\_virales,

Bacteria\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Bacteria\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Bacteria\_Aeromonas\_salmonicida,  
Bacteria\_Flexibacter\_psychrophilus, Otros\_agentes\_bacterianos)

Para la vista 4:

Vista 4 (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie, Código\_lote,  
Virus\_IPNV, Virus\_VHSV, Virus\_IHNV, Virus\_de\_la\_EIBS,  
Virus\_Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1, Patógeno\_Herpesvirus\_Salmonis\_tipo\_2,  
Virus\_Retrovirus\_PL, Otros\_agentes\_virales,  
Bacteria\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Bacteria\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Bacteria\_Aeromonas\_salmonicida,  
Bacteria\_Flexibacter\_psychrophilus,  
Bacteria\_Vibrio\_salmonicida, Bacteria\_Edwardsiella\_tarda,  
Bacteria\_Yersinia\_ruckeri,  
Otros\_agentes\_bacterianos)

Para la vista 5:

Vista 5 (Fecha\_encuesta, Centro\_cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, Proveedor\_pre-smolt, Código\_lote,  
Números\_jaulas, Peso\_promedio\_individual,  
Fecha\_droga, Droga\_Macrólidos, Droga\_Nitrofuranos,  
Droga\_Quinolona, Droga\_Tetraciclinas, Droga\_Sulfamidas  
Droga\_Sulfamidas\_asociadas, Fecha, Sustancia\_química  
Sustancia\_química\_ácido\_acético,  
Sustancia\_química\_Cloruro de Sodio,  
Sustancia\_química\_Dibromuro\_de\_Diquat,  
Sustancia\_química\_Formol, Sustancia\_química\_Furazolidona,  
Sustancia\_química\_Niclosamida,  
Sustancia\_química\_Permanganato\_de\_potasio,  
Sustancia\_química\_Verde\_malaquita,  
Mortalidad\_Transporte, Mortalidad\_fecha\_actual,  
Letargia/Apatía, Peces\_orillando,  
Inapetencia, Pérdida\_equilibrio, Peces\_erráticos,  
Coloración\_oscura, Úlceras\_llagas\_visibles,  
Aletas\_deshilachadas, Ano\_rojo, Boca\_roja, Pérdida\_escamas,  
Hinchazón\_lateral, Manchas\_blancas, Mortalidad\_1,  
Mortalidad\_2, Mortalidad\_3, Mortalidad\_4, Mortalidad\_5,  
Mortalidad\_6, Mortalidad\_7, temp\_mañana\_7, temp\_medio\_7,  
temp\_tarde\_7, temp\_prom\_7, temp\_mañana\_6, temp\_medio\_6,  
temp\_tarde\_6, temp\_prom\_6, temp\_mañana\_5, temp\_medio\_5,  
temp\_tarde\_5, temp\_prom\_5, temp\_mañana\_4, temp\_medio\_4,  
temp\_tarde\_4, temp\_prom\_4, temp\_mañana\_3, temp\_medio\_3,

temp\_tarde\_3, temp\_prom\_3, temp\_mañana\_2, temp\_medio\_2,  
temp\_tarde\_2, temp\_prom\_2, temp\_mañana\_1, temp\_medio\_1,  
temp\_tarde\_1, temp\_prom\_1, transp\_7, transp\_6, transp\_5,  
transp\_4, transp\_3, transp\_2, transp\_1)

Para la vista 6:

Vista 6 (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie, Código\_lote,  
Virus\_IPNV, Virus\_VHSV, Virus\_IHNV, Virus\_de\_la\_EIBS,  
Virus\_Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1, Patógeno\_Herpesvirus\_Salmonis\_tipo\_2,  
Virus\_Retrovirus\_PL, Otros\_agentes\_virales,  
Bacteria\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Bacteria\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Bacteria\_Aeromonas\_salmonicida,  
Bacteria\_Flexibacter\_psychrophilus,  
Bacteria\_Vibrio\_salmonicida, Bacteria\_Edwardsiella\_tarda,  
Bacteria\_Yersinia\_ruckeri,  
Otros\_agentes\_bacterianos)

Para la vista 7:

Vista 7 (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, Proveedor\_smolt, Código\_lote,  
Número\_jaulas, Peso\_promedio\_individual,  
Mortalidad\_transporte, mortalidad\_fecha\_actual,  
Letargia/Apatía, Peces\_orillando,  
Inapetencia, Pérdida\_equilibrio,  
Ulceras\_llagas\_visibles, Aletas\_deshilachadas,  
Hinchazón\_lateral, Manchas\_blancas, Peces\_erráticos,  
Pérdida\_de\_escamas, Ano\_Rojo, Fecha\_droga, Droga\_Macrólidos,  
Droga\_Nitrofuranos, Droga\_Quinolonas, Droga\_Tetraciclinas,  
Droga\_Sulfamidas, Droga\_Sulfamidas\_asociadas, Fecha\_  
Sustancia\_química, Sustancia\_química\_ácido\_acético,  
Sustancia\_química\_Cloruro\_de\_Sodio,  
Sustancia\_química\_Dibromuro\_de\_Diquat,  
Sustancia\_química\_Formol, Sustancia\_química\_Furazolidona,  
Sustancia\_química\_Niclosamida,  
Sustancia\_química\_Permanganato\_de\_potasio,  
Sustancia\_química\_Verde\_malaquita)

Para la vista 8:

Vista 8 (Fecha\_encuesta, Centro\_cultivo, Especie, IPNV, IHNV,  
Retrovirus\_PL, Otros\_agentes\_virales,  
Renibacterium\_salmoninarum, Piscirickettsia\_salmonis,  
Vibrio\_salmonicida, Otros\_agentes\_bacterianos)

Para la vista 9:

Vista 9 (nombre, rut, dirección, responsable, teléfono\_principal  
fax, frecuencia\_radial)

Vista 9a (teléfonos\_secundarios,  
descripción\_teléfonos\_secundarios)

Para la vista 10:

Vista 10 (nombre, dirección, responsable, teléfono\_principal,  
fax, frecuencia\_radial, tipo\_centro, región,  
latitud, longitud, ubicación)

Para la vista 11:

Vista 11 (nombre, dirección, país, ovas\_infectadas)

Para la vista 12:

Vista 12 (nombre, rut, dirección, teléfono, fax, tipo\_análisis)

Para la vista 13:

Vista 13 (nombre\_común, nombre\_científico)

Para la vista 14:

Vista 14 (virus\_IPN\_x, Virus\_IPN\_xi, Virus\_IPN\_xii,  
virus\_IHN\_x, Virus\_IHN\_xi, Virus\_IHN\_xii,  
Retrovirus\_PL\_x, Retrovirus\_PL\_xi, Retrovirus\_PL\_xii,  
virus\_VHS\_x, Virus\_VHS\_xi, Virus\_VHS\_xii,  
Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1\_x, Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1\_xi,  
Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1\_xii, Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_2\_x,  
Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_2\_xi, Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_2\_xii,  
Renibacterium\_x, Renibacterium\_xi, Renibacterium\_xii,  
Piscirickettsia\_x, Piscirickettsia\_xi, Piscirickettsia\_xii,  
Aeromonas\_x, Aeromonas\_xi, Aeromonas\_xii,  
Vibrio\_x, Vibrio\_xi, Vibrio\_xii,  
Edwardsiella\_x, Edwardsiella\_xi, Edwardsiella\_xii,  
Yersinia\_x, Yersinia\_xi, Yersinia\_xii,

Flexibacter\_x, Flexibacter\_xi, Flexibacter\_xii,  
Ceratomyxa\_x, Ceratomyxa\_xi, Ceratomyxa\_xii)

## 2.7.- Obtención del modelo de datos conceptual

Luego, utilizando información semántica se pasará a denominar las vistas con nombres significativos, los que formarán las entidades del modelo conceptual.

**Encuesta\_ova** (Fecha\_encuesta, Centro\_cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, Código\_lote, Proveedor\_ova, Total\_ovas,  
Diagnóstico\_muestreo, Diagnóstico\_padre\_a\_padre,  
Patógeno\_IPVN, Patógeno\_VHSV, Patógeno\_IHVN,  
Patógeno\_Virus de la EIBS  
Patógeno\_Herpesvirus Salmonis tipo 1  
Patógeno\_Herpesvirus Salmonis tipo 2, Patógeno\_Retrovirus\_PL,  
Patógeno\_otros agentes virales,  
Patógeno\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Patógeno\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Patógeno\_Aeromonas\_salmonicida, Patógeno\_Yersinia\_ruckeri,  
Patógeno\_Flexibacter\_psychrophilus,  
Patógeno\_otros agentes bacterianos,  
Patógeno\_Ceratomyxa\_shasta,  
Patógeno\_otros agentes infecciosos,  
Test\_Efecto citopático, Test\_Elisa, Test\_PCR, Test\_IFAT,  
Test\_Otros, Inyección de antibióticos, Mortalidad,  
Transporte, Hongos, Bacterias, Ambiente, Otros,  
Desinfección, Antibióticos, Solución salina,  
Verde-malaquita, Otros, temp\_max\_7, temp\_min\_7, temp\_max\_6,  
temp\_min\_6, temp\_max\_5, temp\_min\_5, temp\_max\_4, temp\_min\_4,  
temp\_max\_3, temp\_min\_3, temp\_max\_2, temp\_min\_2, temp\_max\_1,  
temp\_min\_1, Inspección\_sanitaria)

**Tiene\_antibióticos** (Inyección de antibióticos, días\_antes)

**Encuesta\_alevín** (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, como\_ova, como\_alevín,  
Código\_lote, Proveedor\_alevín, Total\_alevines,  
Mortalidad\_primera\_alimentación, mortalidad\_momento\_traslado  
mortalidad\_término\_alevinaje, Letargia/Apatía,  
Natación\_errática, Natación\_tirabuzón, Inapetencia,  
Boqueo, Otros, Tercio\_posterior\_oscuro,  
Aletas\_deshilachadas, Manchas\_rojas\_riñón,  
Zonas\_blanquecinas, velo\_azul, Cabeza\_alfiler, Otros  
Fecha\_droga, Droga\_Macrólidos, Droga\_Nitrofuranos  
Droga\_Quilinas, Droga\_Tetraciclinas, Droga\_Sulfamidas

Droga\_Sulfamidas\_asociadas, Fecha, Sustancia\_química  
Sustancia\_química\_ácido\_acético,  
Sustancia\_química\_Cloruro de Sodio,  
Sustancia\_química\_Dibromuro\_de\_Diquat,  
Sustancia\_química\_Formol, Sustancia\_química\_Furazolidona,  
Sustancia\_química\_Niclosamida,  
Sustancia\_química\_Permanganato\_de\_potasio,  
Sustancia\_química\_Verde\_malaquita,  
temp\_max\_7, temp\_min\_7, temp\_max\_6, temp\_min\_6, temp\_max\_5,  
temp\_min\_5, temp\_max\_4, temp\_min\_4, temp\_max\_3, temp\_min\_3,  
temp\_max\_2, temp\_min\_2, temp\_max\_1, temp\_min\_1,  
Inspección\_sanitaria)

**Encuesta laboratorio ova** (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo,  
Especie, Código\_lote, Virus\_IPNV, Virus\_VHSV, Virus\_IHNV,  
Virus\_de\_la\_EIBS, Virus\_Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1,  
Patógeno\_Herpesvirus\_Salmonis tipo 2, Virus\_Retrovirus\_PL,  
Otros\_agentes\_virales, Bacteria\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Bacteria\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Bacteria\_Aeromonas\_salmonicida,  
Bacteria\_Flexibacter\_psychrophilus, Otros\_agentes\_bacterianos)

**Encuesta laboratorio alevín** (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo,  
Especie, Código\_lote, Virus\_IPNV, Virus\_VHSV, Virus\_IHNV,  
Virus\_de\_la\_EIBS, Virus\_Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1,  
Patógeno\_Herpesvirus\_Salmonis tipo 2, Virus\_Retrovirus\_PL,  
Otros\_agentes\_virales, Bacteria\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Bacteria\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Bacteria\_Aeromonas\_salmonicida,  
Bacteria\_Flexibacter\_psychrophilus  
Bacteria\_Vibrio\_salmonicida, Bacteria\_Edwardsiella\_tarda,  
Bacteria\_Yersinia\_ruckeri,  
Otros\_agentes\_bacterianos)

**Encuesta pre-smolt** (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, Código\_lote, Proveedor\_pre-smolt,  
Números\_jaulas, Peso\_promedio\_individual, Fecha\_droga,  
Droga\_Macrólidos, Droga\_Nitrofuranos, Droga\_Quilinas,  
Droga\_Tetraciclinas, Droga\_Sulfamidas,  
Droga\_Sulfamidas\_asociadas, Fecha, Sustancia\_química  
Sustancia\_química\_ácido\_acético,  
Sustancia\_química\_Cloruro de Sodio,  
Sustancia\_química\_Dibromuro\_de\_Diquat,  
Sustancia\_química\_Formol, Sustancia\_química\_Furazolidona,  
Sustancia\_química\_Niclosamida,  
Sustancia\_química\_Permanganato\_de\_potasio,

Sustancia\_química\_Verde\_malaquita,  
Mortalidad\_Transporte, Mortalidad\_fecha\_actual,  
Letargia/Apatía, Peces\_orillando,  
Inapetencia, Pérdida\_equilibrio, Peces\_erráticos,  
Coloración\_oscura, Ulceras\_llagas\_visibles,  
Aletas\_deshilachadas, Ano\_rojo, Boca\_roja, Pérdida\_escamas,  
Hinchazón\_lateral, Manchas\_blancas, Mortalidad\_1,  
Mortalidad\_2, Mortalidad\_3, Mortalidad\_4, Mortalidad\_5,  
Mortalidad\_6, Mortalidad\_7, temp\_mañana\_7, temp\_medio\_7,  
temp\_tarde\_7, temp\_prom\_7, temp\_mañana\_6, temp\_medio\_6,  
temp\_tarde\_6, temp\_prom\_6, temp\_mañana\_5, temp\_medio\_5,  
temp\_tarde\_5, temp\_prom\_5, temp\_mañana\_4, temp\_medio\_4,  
temp\_tarde\_4, temp\_prom\_4, temp\_mañana\_3, temp\_medio\_3,  
temp\_tarde\_3, temp\_prom\_3, temp\_mañana\_2, temp\_medio\_2,  
temp\_tarde\_2, temp\_prom\_2, temp\_mañana\_1, temp\_medio\_1,  
temp\_tarde\_1, temp\_prom\_1, transp\_7, transp\_6, transp\_5,  
transp\_4, transp\_3, transp\_2, transp\_1)

**Encuest\_laboratorio\_pre-smolt** (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo,  
Especie, Código\_lote, Virus\_IPNV, Virus\_VHSV, Virus\_IHNV,  
Virus\_de\_la\_EIBS, Virus\_Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1,  
Patógeno\_Herpesvirus\_Salmonis\_tipo\_2, Virus\_Retrovirus\_PL,  
Otros\_agentes\_virales, Bacteria\_Renibacterium\_salmoninarum,  
Bacteria\_Piscirickettsia\_salmonis,  
Bacteria\_Aeromonas\_salmonicida,  
Bacteria\_Flexibacter\_psychrophilus  
Bacteria\_Vibrio\_salmonicida, Bacteria\_Edwardsiella\_tarda,  
Bacteria\_Yersinia\_ruckeri,  
Otros\_agentes\_bacterianos)

**Encuesta\_smolt** (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo, Especie,  
Fecha\_ingreso\_centro, Código\_lote, Proveedor\_smolt,  
Números\_jaulas, Peso\_promedio\_individual,  
Mortalidad\_transporte, mortalidad\_fecha\_actual,  
Letargia/Apatía, Peces\_orillando,  
Inapetencia, Pérdida\_equilibrio, Ulceras\_llagas\_visibles,  
Aletas\_deshilachadas, Hinchazón\_lateral, Manchas\_blancas,  
Peces\_erráticos, pérdida de escamas, ano\_rojo, fecha\_droga,  
Droga\_Macrólidos, Droga\_Nitrofuranos, Droga\_Quilínonas,  
Droga\_Tetraciclinas, Droga\_Sulfamidas,  
Droga\_Sulfamidas\_asociadas, Fecha, Sustancia\_química  
Sustancia\_química\_ácido\_acético,  
Sustancia\_química\_Cloruro de Sodio,  
Sustancia\_química\_Dibromuro\_de\_Diquat,  
Sustancia\_química\_Formol, Sustancia\_química\_Furazolidona,  
Sustancia\_química\_Niclosamida,

Sustancia\_química\_Permanganato\_de\_potasio,  
Sustancia\_química\_Verde\_malaquita,

Encuesta\_laboratorio\_smolt (Fecha\_encuesta, Centro\_Cultivo,  
Especie, IPNV, IHNV, Retrovirus\_PL, Otros\_agentes\_virales  
Renibacterium\_salmoninarum, Piscirickettsia\_salmonis,  
Vibrio\_salmonicida, Otros\_agentes\_bacterianos)

Empresa\_casa\_matriz (nombre, rut, dirección, responsable,  
teléfono\_principal, fax, frecuencia\_radial)

Teléfonos (teléfonos\_secundarios, descripción\_teléfonos\_secundarios)

Centro\_cultivo (nombre, dirección, responsable,  
teléfono\_principal, fax, frecuencia\_radial, tipo\_centro,  
latitud, longitud, ubicación)

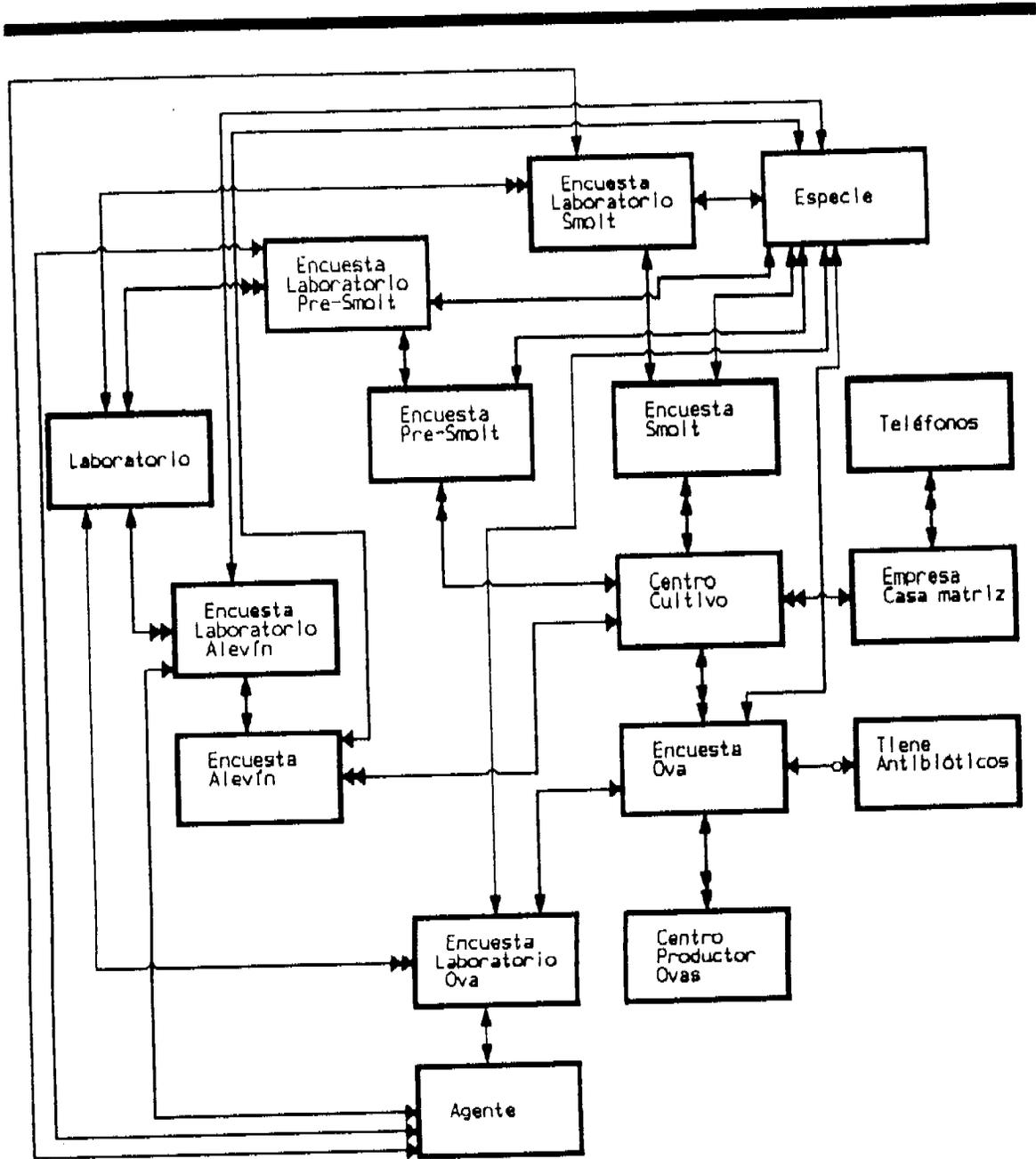
Centro\_productor\_ova (nombre, dirección, país, ovas\_infectadas)

Laboratorio (nombre, rut, dirección, teléfono, fax, tipo\_análisis)

Especies (nombre\_común, nombre\_científico)

Agentes (virus\_IPN\_x, Virus\_IPN\_xi, Virus\_IPN\_xii,  
virus\_IHN\_x, Virus\_IHN\_xi, Virus\_IHN\_xii,  
Retrovirus\_PL\_x, Retrovirus\_PL\_xi, Retrovirus\_PL\_xii,  
virus\_VHS\_x, Virus\_VHS\_xi, Virus\_VHS\_xii,  
Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1\_x, Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1\_xi,  
Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_1\_xii, Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_2\_x,  
Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_2\_xi, Herpesvirus\_salmonis\_Tipo\_2\_xii,  
Renibacterium\_x, Renibacterium\_xi, Renibacterium\_xii,  
Piscirickettsia\_x, Piscirickettsia\_xi, Piscirickettsia\_xii,  
Aeromonas\_x, Aeromonas\_xi, Aeromonas\_xii,  
Vibrio\_x, Vibrio\_xi, Vibrio\_xii,  
Edwardsiella\_x, Edwardsiella\_xi, Edwardsiella\_xii,  
Yersinia\_x, Yersinia\_xi, Yersinia\_xii,  
Flexibacter\_x, Flexibacter\_xi, Flexibacter\_xii,  
Ceratomyxa\_x, Ceratomyxa\_xi, Ceratomyxa\_xii)

El modelo conceptual obtenido de las vistas queda, por lo tanto, como lo indica la figura 14



**Figura 14**  
 Modelo de datos conceptual obtenido de las vistas

## 2.8.- Modelo de datos entidad-relación

Durante la obtención del modelo de datos conceptual a través de las vistas, existe información semántica que no es posible modelar mediante éste.

Es así que se cree conveniente mostrar en la figura 15, el modelo de datos entidad-relación que deja en evidencia la semántica involucrada en el modelo conceptual.

## 3 Implementación del diseño.

La forma de desarrollar el sistema computacional será mediante la generación de prototipos, los que permiten una adecuada interacción con el usuario.

La cantidad de personal involucrado en el diseño y codificación de los módulos del sistema se reduce dramáticamente al existir una forma de codificación mediante prototipos.

El lenguaje seleccionado para la implementación del sistema es Visual Basic Pro 3.00, debido a que soporta en forma natural y eficiente el desarrollo mediante prototipos, además de permitir un acceso a tablas definidas implementativamente como relacionales y basadas en el estándar que define el administrador de bases de datos, Microsoft Access.

Para implementar este sistema se requiere como mínimo un computador IBM PC compatible con las siguientes características:

CPU: 80386 o superior

RAM: 4 Mb o más

HD: 170 Mb o más

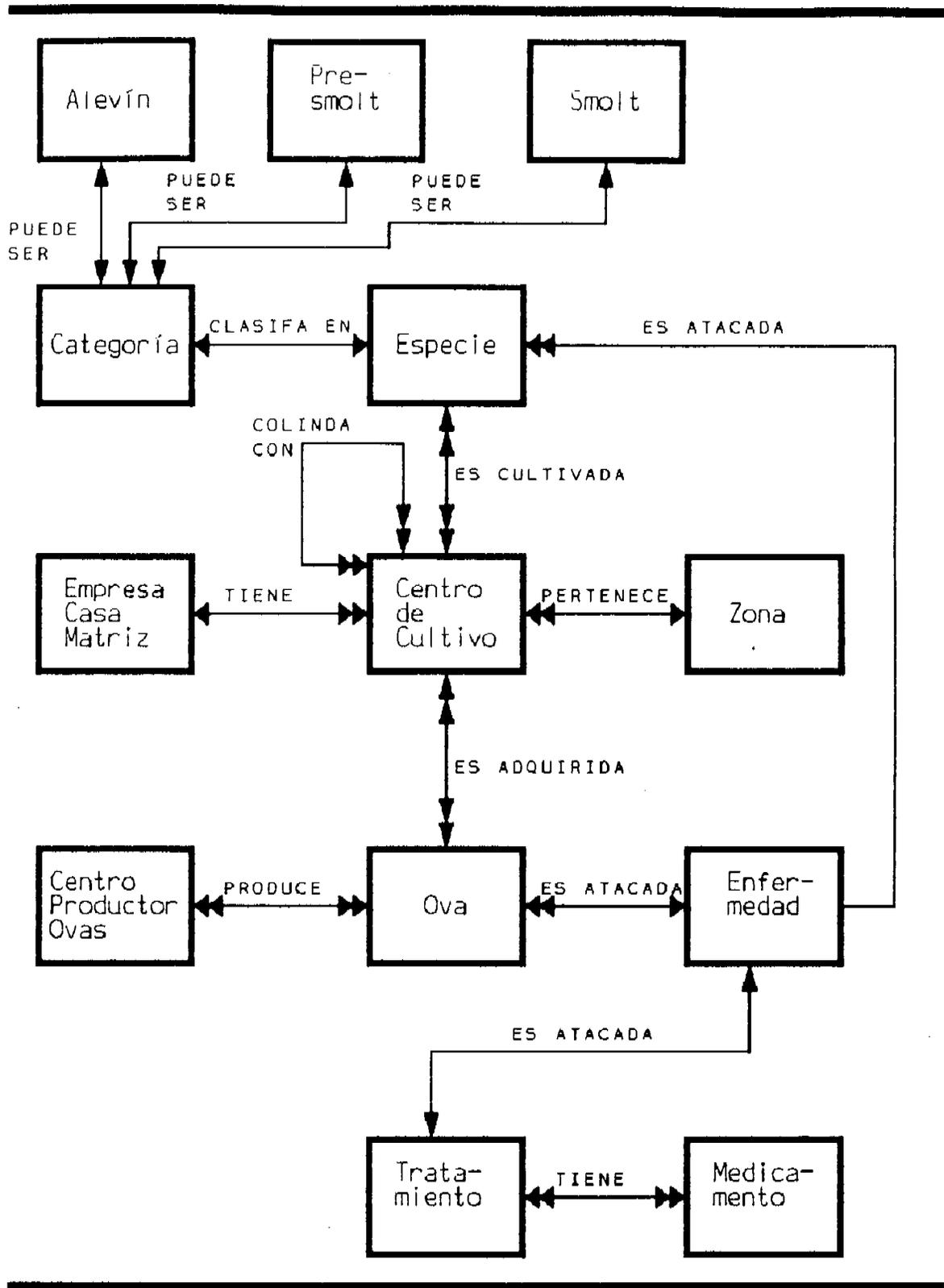
Tarjeta gráfica: VGA

FDD: 3½" 1,44 Mb

además de una impresora compatible con Microsoft Windows 3.1 y el software Microsoft Windows 3.1.

Cabe hacer notar que durante la ejecución de la codificación de los prototipos, éstos han variado la presentación de la interfaz humano-computador, desde menús separados por acciones a las tablas involucradas, hasta la actual forma de menús por procesos, que es la que actualmente se codificó por ser más natural para el usuario final, en su accionar diario con el sistema.

El diseño obtenido en las etapas anteriores, está implantado en el formato propuesto por Microsoft Access, donde en los listados están especificados los formatos de los registros y características de los atributos claves entre otras.



**Figura 15**  
Modelo de datos entidad-relación

**MANUAL DEL USUARIO**

**PROGRAMA PINCOYA**

# MANUAL DEL USUARIO

## SISTEMA PINCOYA

El Sistema Pincoya está diseñado para trabajar interactivamente con el usuario en forma expedita y simple. Para estos efectos, consta de diversos módulos interconectados entre si que se activan a través de pantallas autoexplicativas de fácil acceso.

Este breve manual presenta resumidamente las características básicas del Sistema.

### **Instalación.**

El Sistema Pincoya se instala desde Windows siguiendo el procedimiento habitual. Para llevar a cabo la instalación, ejecute el programa SETUP.EXE que se encuentra en el Disco 1 y siga las instrucciones.

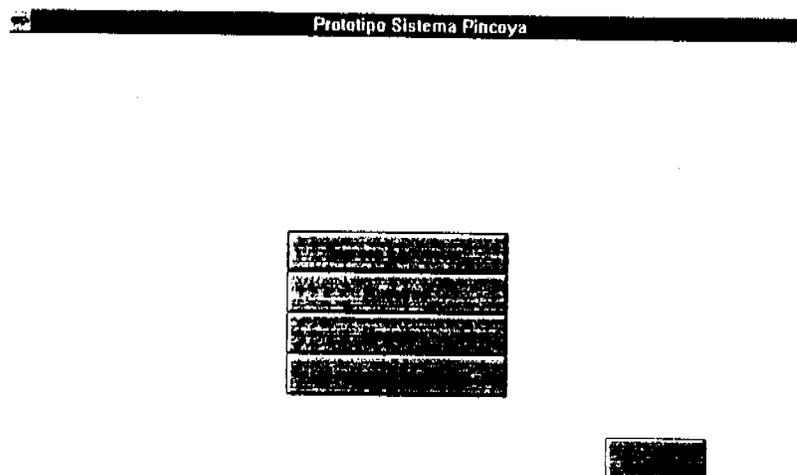
### **Inicio de la Aplicación.**

Para iniciar la aplicación :

- 1.- Abra el grupo de aplicaciones
- 2.- Haga doble clic en el ícono **Pincoya**.

Aparecerá la siguiente ventana del Sistema Pincoya

## Menú Principal.



**Figura 1.-**

Los botones centrales representan las funciones principales del Sistema Pincoya. Las revisaremos en líneas generales, explicando brevemente algunas pantallas y dando algunas definiciones básicas que ilustren el uso del Sistema.

Cada uno de los botones del menú se activa con el mouse o pulsando la correspondiente letra subrayada mientras se mantiene presionada la tecla "Alt" o posicionándose sobre el botón y apretando "Enter". Este procedimiento se ocupa a través de las distintas pantallas que aparecen en el Sistema Pincoya.

El botón "Ingreso Encuestas" selecciona el módulo que permite digitar las respuestas provenientes de las distintas empresas a las que se les ha enviado formularios con las consultas.

El botón "Muestreo" activa la selección de los centros de empresas que serán encuestados.

El botón "Reportes" permite obtener listados con información relevante acerca del proceso desarrollado.

El botón "Mantención Archivos" accesa al módulo destinado a la mantención de las bases de datos que usa el Sistema Pincoya.

### Ingreso Encuestas.-

Activando el botón "Ingreso de Encuestas", aparece la siguiente pantalla:

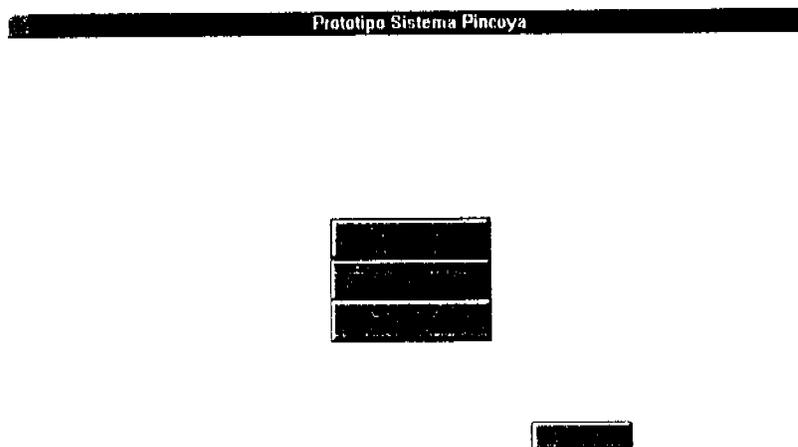


Figura 2.-

Aquí se presentan los tres tipos de Centros involucrados. A modo de ejemplo seleccionaremos "Centro Fluvial". La pantalla que aparece en este caso es:

Prototipo Sistema Pincoya



Figura 3.-

En un Centro Fluvial, existe interés en consultar acerca de ovas y alevines. Hay dos tipos de encuestas para cada uno de estos casos. Una está dirigida al Centro y otra a un Laboratorio. Para ingresar las respuestas se debe activar el botón correspondiente. A modo de ejemplo activemos "Encuesta Ovas". La pantalla resultante es la siguiente:

Encuesta de Ovas Centro Fluvial

Empresa       Especie  
 Centro de Cultivo       Fecha de Ingreso  
 Proveedor       Fecha Encuesta  
 Total Ovas       Código Lote

Historia Sanitaria de los Padres

Diagnóstico por Muestreo       Diagnóstico Padre a Padre  
 Patógenos analizados o Certificados libres de ...

IPNV       Retrovirus salmonis Tipo1  
 VHSV       Retrovirus salmonis Tipo 2  
 IHNV       Retrovirus PL  
 Virus de la EIBS       Otros agentes virales  
 Renibacterium salmoninarum       Yersinia ruckeri  
 Piscirickettsia salmonis       Flexibacter psychrophilus  
 Aeromonas salmonicida       Otros agentes bacterianos  
 Ceratomyxa shasta       Otros agentes infecciosos

Tratamiento previos al desova  
 Inyección de Antibióticos  
 10 días       10 a 30 días      Antes del Desova  
 30 o más días

Test utilizados  
 Efecto citopático  
 Elisa  
 PCR  
 IFAT  
 Otros

Historia de las Ovas

Mortalidad  
 Total al Periodo de Eclosión  %

Transporte  
 Hongos  
 Bacterias  
 Ambiente  
 Otros

Tratamiento de las Ovas  
 Preventivos       Desinfección  
 Curativos       Antibióticos  
 Solución Salina  
 Verde Malaquita  
 Otros

Especificar

Otros

Temperatura	7	6	5	4	3	2	1
Máxima							
Mínima							

Ultima Inspección Sanitaria

Figura 4.-

Estas pantallas, al igual que todas las del Sistema Pincoya, están asociadas a sendos formularios de encuesta. La pantalla y el formulario asociado tienen los mismos campos.

Los campos que aparecen en estas pantallas, se llenan en forma distinta. El primero se llena haciendo clic con el mouse en el cuadro pertinente. Este, al ser activado presenta una marca de cruz en su interior. Un caso de este tipo es el correspondiente al "Test utilizado".

También aparecen campos que se llenan directamente con la información pertinente. Como ejemplo de este caso tenemos los casilleros asociados con temperatura.

Finalmente, destacamos un tercer tipo de campo que tiene conexión con la base de datos asociada y que puede llamarla para hacer un ingreso automático usando el botón derecho del mouse. De este tipo es el campo "Casa Matriz", que para ser llenado basta marcarlo con el botón derecho del mouse. Esto despliega un listado con los nombres de las distintas casas matrices contenidas en la base de datos; de éste se selecciona una con el botón izquierdo del mouse. Este método de llenado tiene la gran ventaja de completar un campo con un nombre de empresa exactamente igual al que existe en los archivos, evitando errores en la verificación de la información.

#### Muestreo.-

Al marcar el botón "Muestreo", aparece la siguiente pantalla:

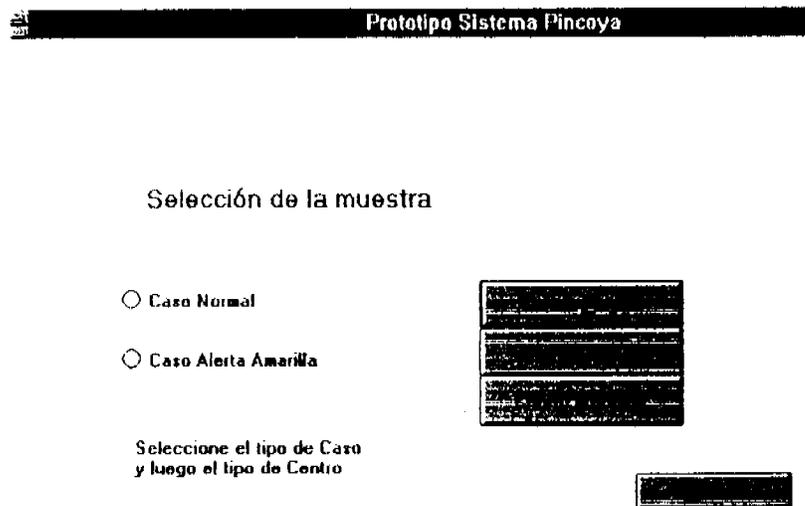


Figura 5.-

Para seleccionar una muestra, primero debe marcarse uno de los botones circulares correspondientes al caso bajo el cual se realiza el muestreo: Caso Normal o Caso Alerta Amarilla. A continuación se marca el tipo de centro que será muestreado. A modo de

ejemplo seleccionaremos una muestra de "Centro Fluvial" en Caso Normal con lo que tenemos la pantalla:

**Prototipo Sistema Pincoya**

**Especificaciones Técnicas de la Muestra**

Nivel de Confianza	<input type="text" value="0.95"/>	
Precisión	<input type="text" value=".1"/>	
Estimación adelantada	<input type="text" value="0.5"/>	

**Figura 6.-**

Aquí aparecen tres recuadros con información que debe proveer el usuario.

El primero es el nivel de confianza usada en la estimación de las proporciones. El programa propone como valor por defecto a 0.95. Además de éste, con el botón derecho del mouse se puede desplegar un listado de valores de niveles de confianza que están implementados en el sistema.

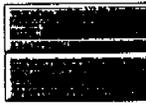
A continuación, aparece el cuadro que debe llenarse con la precisión deseada para la estimación de la proporción. Se debe insertar un número decimal entre 0 y 1.

En el tercer cuadro se pide una estimación inicial aproximada de la proporción considerada. Aquí se propone un valor por defecto igual a 0.5, que es el más conservador al entregar la muestra de mayor tamaño.

ejemplo seleccionaremos una muestra de "Centro Fluvial" en Caso Normal con lo que tenemos la pantalla:

**Prototipo Sistema Pincoya**

**Especificaciones Técnicas de la Muestra**

Nivel de Confianza	<input type="text" value="0.95"/>	
Precisión	<input type="text" value=".1"/>	
Estimación adelantada	<input type="text" value="0.5"/>	

**Figura 6.-**

Aquí aparecen tres recuadros con información que debe proveer el usuario.

El primero es el nivel de confianza usada en la estimación de las proporciones. El programa propone como valor por defecto a 0.95. Además de éste, con el botón derecho del mouse se puede desplegar un listado de valores de niveles de confianza que están implementados en el sistema.

A continuación, aparece el cuadro que debe llenarse con la precisión deseada para la estimación de la proporción. Se debe insertar un número decimal entre 0 y 1.

En el tercer cuadro se pide una estimación inicial aproximada de la proporción considerada. Aquí se propone un valor por defecto igual a 0.5, que es el más conservador al entregar la muestra de mayor tamaño.

Si en el ejemplo considerado, aceptamos los valores por defecto e ingresamos una precisión igual 0.1, tenemos la siguiente pantalla.

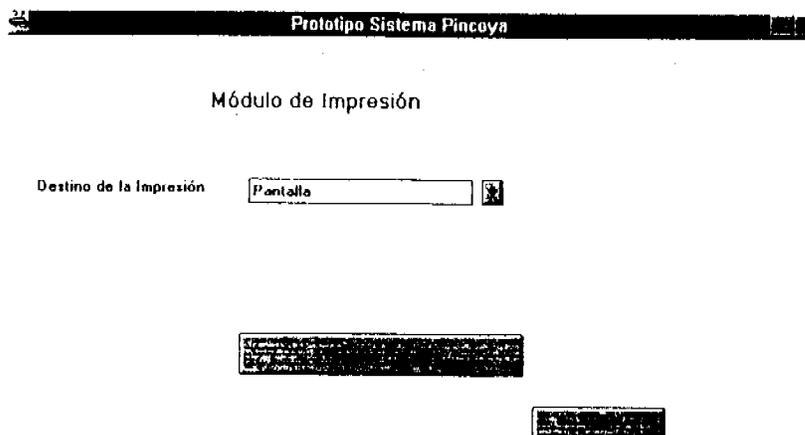


Figura 7.-

Aquí se selecciona el destino de la impresión: por Pantalla o por Impresora. Hecha la selección, aparece impreso el conjunto de Centros seleccionados.

#### Reportes.-

Seleccionando el botón "Reportes" aparece el siguiente cuadro:

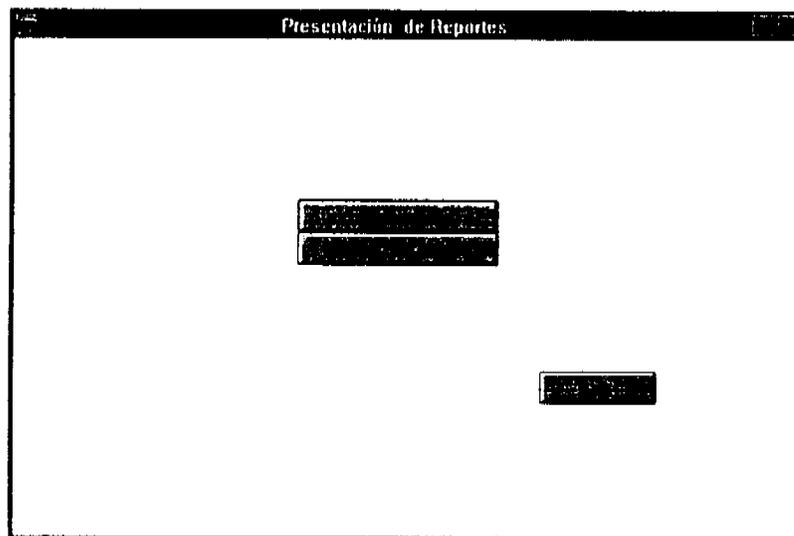
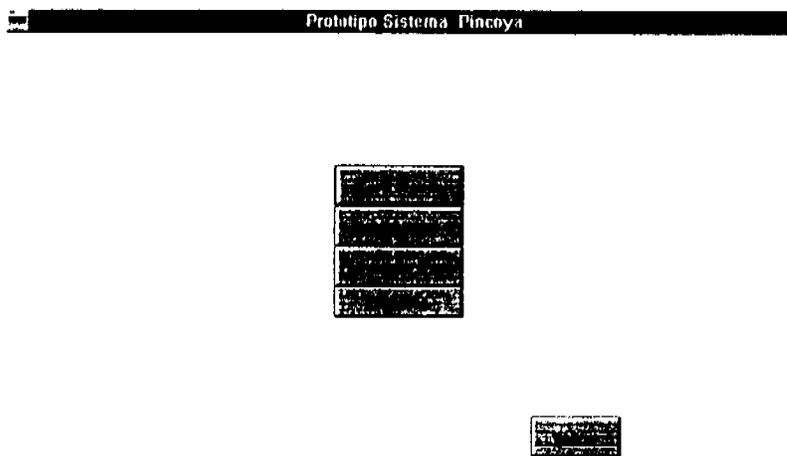


Figura 8.-

Al presionar el botón "Histórico", se genera una lista de todos los centros que han sido seleccionados en una muestra. El botón "Centros con Alerta", produce un listado con los centros cuyas respuestas a las encuestas han sobrepasado alguno de los límites establecidos para control de Alerta Amarilla.

### **Mantención de Archivos**

Esta sección permite ingresar la información referente a los distintos archivos básicos usados en el Sistema. Es absolutamente necesario actualizar estos archivos antes de realizar el muestreo correspondiente a cada etapa para evitar errores debido a información básica inexistente o equivocada.



**Figura 9.-**

Los botones "Casa Matriz", "Laboratorios" y "Proveedor de Ovas" conducen a las pantallas destinadas a mantener los archivos asociados a las instituciones que participan en el sistema. Su llenado es autoexplicativo.

El botón "Especies" despliega una pantalla con la cual se mantiene el archivo que contiene los nombres de los distintos peces controlados por el sistema.

Finalmente, el botón "Agentes" permite mantener actualizados los límites máximos permitidos para la presencia de posibles agentes en las Regiones X, XI y XII. Se supone que estos límites pueden sufrir variaciones en el tiempo y deben ser especificados por el usuario responsable. Su determinación tiene un efecto importante en el funcionamiento del sistema, por lo tanto se debe tener sumo cuidado de proporcionar estimaciones de la mayor exactitud posible.

Es importante destacar que los archivos creados por el Sistema Pincoya, pueden ser consultados por el administrador de bases de datos ACCESS 2.0 de Microsoft.

El programa PINCOYA, se entrega en dos diskettes de 3.5".

El primero de ellos contiene 32 archivos, incluyendo el programa instalador (SETUP.EXE) :

COMMDLG	.DL_	50924
CRPE	.DL_	385005
CRXLATE	.DL_	11073
CTL3D	.DL_	11511
GSWDLL	.DL_	30948
MSAES110	.DL_	18931
OBDC	.DL_	25437
OBDCINST	.DL_	40998
PDBJET	.DL_	39672
SETUPKIT	.DL_	3657
VBDB300	.DL_	59761
VBRUN300	.DL_	276684
VER	.DL_	9728
GSW	.EX_	138927
PINCOYA	.EX_	114134
SETUP1	.EX_	14538
SHARE	.EX_	9376

SETUP	.EXE	15312
ODBCINST	.HL_	16065
BDPROY	.LD_	131
SETUP	.LST	49
CMCC	.RP_	5108
RAGENTES	.RP_	5274
RESPECIE	.RP_	4913
CRYSTAL	.VB_	15060
GAUGE	.VB_	17529
GRAPH	.VB_	40938
GRID	.VB_	27658
KEYSTAT	.VB_	10928
MSMASKED	.VB_	18430
MSOUTLIN	.VB_	14888
SPIN	.VB_	10978

El segundo diskette, contiene los 15 archivos restantes:

MSABC110	.DL_	210799
MSAJT110	.DL_	424435
PDCTJET	.DL_	26192
PDIRJET	.DL_	27505
BDPROY	.MD_	181319
RHISAMA	.RP_	5214
RLAB	.RP_	4919
RMED	.RP_	4970
RMUESTRA	.RP_	4888
RMUETRA	.RP_	5052
ROTAMA	.RP_	5077
RPO	.RP_	4995
RPRUEBA	.RP_	5005
RTODAMA	.RP_	5233
RYELLOW	.RP_	4948

## PUESTA EN MARCHA DEL SISTEMA DE ALERTA.

Todo sistema complejo, como el que aquí se está presentando, tiene una etapa de puesta en marcha que requiere de cuidados especiales por parte de los responsables de su funcionamiento. Esto es necesario para suavizar al máximo las dificultades inevitables propias de un prototipo que comienza con información incompleta y sin experiencia acumulada de parte de los distintos actores. En consecuencia, se debe tener el cuidado de preparar detalladamente todos los aspectos que ayuden a evitar dificultades en los momentos iniciales.

Previo a la implementación del sistema, debe establecerse un listado de **laboratorios autorizados**, para ser consultados por la(s) empresa(s) cuando el sistema lo requiera. Estos laboratorios deben ser chequeados respecto de su equipamiento, experiencia del personal a cargo y otros requerimientos que el organismo administrador del sistema establezca.

El sistema comienza a funcionar durante un periodo de "marcha blanca" donde el prototipo diseñado es puesto a prueba y sometido a las correcciones que se estime apropiadas. Esta confrontación con la realidad es imprescindible para obtener una representatividad del modelo acorde a las exigencias y necesidades de cada una de las regiones del país en las que será aplicado. Este período de marcha blanca es también el momento oportuno para realizar diversas actividades transitorias, pero de gran importancia. Sin pretender ser exhaustivos, podemos mencionar las siguientes:

- 1.- Enviar información inicial a todas las empresas participantes, que incluya los fundamentos que dieron origen al proyecto, quienes lo aplican y como funciona
- 2.- Realizar talleres y reuniones de trabajo para interactuar con los diversos especialistas que trabajan en producción de salmonídeos
- 3.- Completar la información básica para el funcionamiento del Sistema
- 4.- Operar aplicando encuestas a todos los centros y no sólo a una muestra, como sería lo normal durante el funcionamiento regular.
- 5.- Determinar las Vecindades de los distintos Centros

## 1.-ENVIO DE INFORMACION ACERCA DEL SISTEMA

El envío de información inicial es una de las actividades previas al comienzo de operación del sistema, que debe realizar la entidad responsable del mismo. Como apoyo a este envío, nos ha parecido oportuno aportar comentarios y sugerencias que podrían estar presente en el informe. Los puntos siguientes contienen un esquema mínimo.

### 1.1.-FUNDAMENTOS QUE DIERON ORIGEN AL SISTEMA.

El crecimiento que ha tenido la producción de salmonídeos en las regiones X, XI y XII durante los últimos años, y su impacto a nivel internacional, ha convertido este sector en uno de los más importantes focos de desarrollo del país. Este mismo crecimiento ha hecho que surja la preocupación por brindar todo el apoyo disponible para mantener, e incluso mejorar, los estándares de calidad que tiendan a asegurar la posición del país como uno de los líderes mundiales en el área.

Chile tiene excelentes condiciones naturales para la producción de salmonídeos, especialmente por la calidad de sus aguas, la ausencia de varias enfermedades presentes en centros de cultivo de otras latitudes y el nivel sanitario alcanzado. Por estas razones, es necesario extremar las medidas de seguridad para preservar y mejorar estas condiciones que otorgan al país importantes ventajas comparativas frente a la competencia internacional.

Es así que, por el gran efecto que tienen las enfermedades denominadas de alto riesgo, en la calidad y cantidad de la producción, se ha decidido diseñar un Sistema de Alerta para la detección, control y eventual erradicación de las mismas.

### 1.2.-RESPONSABLES DEL SISTEMA.

El organismo administrador del sistema, debería tener las siguientes características:

- (a) **Autoridad** suficiente para lograr que se ejecuten las acciones necesarias tanto para alimentar el sistema como para hacer cumplir las medidas requeridas por las alertas.
- (b) **Autonomía**, respecto de los afectados como de los organismos fiscalizadores.

Tal vez sería recomendable que el organismo administrador fuese la propia Subsecretaría de Pesca, a través de una Oficina Técnica creada con este propósito, que opere y esté capacitada para obtener toda la información necesaria para el funcionamiento, procesamiento y alimentación de las bases de datos, y analizarlas de acuerdo a procedimientos establecidos. Dicha oficina habría de servir también como centro de consulta para todos los interesados.

Esta Oficina Técnica sería quien determine las alertas correspondientes y ponga en marcha las acciones de acuerdo a un programa preestablecido.

### 1.3.-FUNCIONAMIENTO GENERAL DEL SISTEMA

#### 1.3.1.- Recolección de información.

El funcionamiento de un ciclo regular del Sistema comienza con el envío de formularios a las Empresas Productoras para que sean respondidos con información de los Centros de Producción que hayan sido seleccionados en una muestra preparada para tal efecto. La información recogida es ingresada a una base de datos y posteriormente analizada mediante comparación con estándares que permiten establecer la presencia de un estado de alerta específico.

#### 1.3.2.- Plan de Muestreo.

En distintos períodos del año, se selecciona un grupo de Centros Productores de acuerdo a un Plan de Muestreo Estadístico que garantiza un nivel de confianza apropiado para la toma de decisiones. En caso de encontrarse un Centro afectado por alguna de las patologías de alto riesgo, más allá de los niveles permitidos, se encuesta a los vecinos. Si entre éstos, aparece un nuevo Centro contaminado, se repite la encuesta a todos sus respectivos vecinos. Este proceso continúa hasta que no aparezcan nuevos Centros contaminados en las vecindades examinadas. De esta forma, se obtiene un panorama apropiado del alcance y profundidad del brote de la enfermedad detectada.

### 1.3.3.- Alerta.

Para los efectos del sistema de vigilancia, el sentido de la palabra **alerta** se referirá a aquellas situaciones de origen biológico o ambiental que revistan peligrosidad para la producción de salmónidos en cultivo.

Una **alerta** es una señal que indica que podría existir o existe una situación de emergencia sanitaria que determina una acción conjunta de autoridades y afectados para emplear los recursos que sean necesarios para el control y/o erradicación de las enfermedades de alto riesgo definidas para este estudio. Dichas acciones estarán orientadas por los principios de ayuda mutua y empleo escalonado de recursos bajo la autoridad encargada de administrar el sistema.

Se distinguen dos grados de alerta: Alerta amarilla (AA) y Alerta roja (RR):

**AA :** Se establece cuando una enfermedad de alto riesgo amenaza con aparecer o propagarse a centros, áreas, sectores o regiones vecinas, o crecer en extensión y severidad de tal forma que permita suponer que podría ser controlada con las medidas preventivas indicadas por la oficina administradora del sistema.

**RR :** Se establece cuando se detecta una enfermedad de alto riesgo no presente en el país, en cuyo caso la oficina administradora del sistema determinará las acciones tendientes a su erradicación, o, en situaciones en que enfermedades presentes se hagan incontrolables dado su crecimiento en extensión y severidad de tal forma que obliguen a tomar medidas destinadas a interrumpir el contagio o aislar su presencia.

#### 1.4.- MANUAL DE TECNICAS.

A pesar del conocimiento generalizado acerca de los distintos procedimientos asociados a la explotación de un Centro de Producción de Salmonídeos, parece importante acentuar al máximo la estandarización de la selección y uso de los mismos. Por esta razón, es conveniente poner al alcance de todos los interesados, el Manual de Técnicas preparado durante el desarrollo de este Proyecto.

#### 2.- TALLERES Y REUNIONES DE TRABAJO.

El funcionamiento de un Sistema como el que nos interesa, no está exento de dificultades para su puesta en marcha, momento en que pueden aflorar múltiples dificultades propias de la ejecución de un prototipo que aún no está completamente afinado. En particular, es necesario que los encargados de los Centros que responden los formularios tengan la oportunidad de plantear sus inquietudes y recibir respuestas relacionadas con su participación.

Para mejorar la recepción de un proyecto de esta naturaleza por parte de todos los que se relacionan con él, deben tener la oportunidad de interactuar unos con otros, de modo que las distintas experiencias disponibles vayan en apoyo del Sistema. Por esto parece conveniente preparar una serie de Talleres y Reuniones de Trabajo entre distintos sectores de especialistas. De este trabajo conjunto podrían surgir aportes importantes, particularmente por la amplitud de puntos de vista presente entre los participantes.

#### 3.- BASES DE DATOS DEL SISTEMA.

El buen funcionamiento del Sistema de Alerta, depende estrechamente de la calidad de la información disponible para la toma de decisiones. Al momento de la puesta en marcha, las bases de datos se encuentran vacías y, en consecuencia, una de las primeras acciones a realizar consiste en llenarlas.

Hay dos tipos de datos usados por el Sistema: los que no afectan al proceso productivo de salmonídeos y los que sí lo afectan.

### 3.1.- Datos que no afectan al proceso productivo.

Estos datos se refieren típicamente a la identificación de los agentes participantes. Aquí incluimos a las Empresas y sus características, a los Laboratorios, a las enfermedades, a los tratamientos, a los medicamentos, etc.

Los datos de Empresas y sus respectivos Centros son cruciales para la aplicación del Plan de Muestreo, por lo que deben ser llenadas en primer lugar, ya que nada puede comenzar sin ellos. Se supone que estos datos varían lentamente, por lo que basta actualizarlos con frecuencia relativamente baja (una vez al año).

Los datos de enfermedades, tratamientos y medicamentos, prácticamente no varían, por lo que una vez obtenidos no será necesario modificarlos a menudo. Estos son datos complementarios cuya ausencia no entraba el funcionamiento del Sistema.

### 3.2.- Datos que afectan al proceso productivo.

Estos son los datos a los que, esencialmente, se refieren las encuestas preparadas en este Proyecto. Tienen que ver con proporción de especímenes afectados por una enfermedad, mortalidad observada, valor de variables ambientales, etc.

La importancia de esta información es evidente, ya que es la que permitirá, en un plazo mediano, investigar las relaciones existentes entre las variables observadas y la mortalidad producida por una enfermedad. Al momento de la puesta en marcha, las consideraciones teóricas hechas en el Proyecto, han permitido plantear algunas condiciones iniciales que, con toda seguridad, necesitarán una revisión a la luz de información confiable proveniente de las distintas Empresas.

#### 4.- ENCUESTAS CENSALES

Debido a la total falencia de datos, el comienzo de la aplicación del Sistema debería tener un procedimiento más completo de generación de los mismos. Es por esto que se propone trabajar, en un primer período, enviando las encuestas pertinentes a todos los Centros en funcionamiento, y no sólo a los seleccionados en una muestra. Esto proporcionará una base más sólida para ajustar los modelos planteados a la realidad de cada una de las tres regiones involucradas. Esta forma censal de encuestar, es la que proporciona antecedentes más claros, pero debido al costo involucrado puede reducirse a una encuesta por muestreo.

#### 5.- VECINDADES DE CENTROS.

Una vez obtenida la información referente a los Centros, es necesario determinar cuáles son los vecinos de cada uno de ellos. Este no es un proceso que pueda realizarse en forma automática, sino todo lo contrario. Cada Centro debe analizarse individualmente, atendiendo a su ubicación geográfica, las características de su entorno, el movimiento del agua, etc.

Esta parte requiere de un equipo de personas que conozca detalladamente las áreas en las que se encuentran los Centros, las características de propagación de las enfermedades y las exigencias propias de las metodologías utilizadas. Afortunadamente, una vez que se establezca y se acepte el conjunto de las vecindades requeridas, no será necesario hacer modificaciones periódicas. Bastará modificar las vecindades con la inclusión o la exclusión de Centros participantes en el Sistema.

## ESTANDARIZACION DE METODOS Y PROCEDIMIENTOS DE DIAGNOSIS, PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO.

Los Métodos estándares que se utilizan para la identificación y detección de ciertos patógenos de peces los estableció la Sociedad Americana de Pesquerías en 1975 (Amos, 1985), y fueron aquellos considerados como los más confiables, sensibles, prácticos y aplicables a un gran número de muestras. La Sección de Salud de los Peces de esta sociedad es considerada líder en materia y sus procedimientos son ampliamente aceptados en Estados Unidos, Europa y Japón. Revisiones posteriores de estos procedimientos han ido incorporando nuevas técnicas desarrolladas que obedecen a la dinámica de la salud de los peces.

Para la detección de agentes virales de peces, se reconocen aquellas técnicas de diagnóstico presunta, basadas en la aparición de efecto citopático en líneas celulares específicas. El diagnóstico confirmatorio se realiza mediante técnicas inmunológicas. Así mismo los procedimientos para la detección de agentes bacterianos están basados en los mismos criterios de diagnóstico presunta mediante pruebas bioquímicas. Para algunas bacterias determinadas se acepta como presunto los frotis de tejidos sometidos a tinciones específicas. El diagnóstico confirmatorio se basa en pruebas inmunológicas para los cuales se han desarrollado diferentes técnicas, las que están en constante evolución. En el caso de los parásitos se describe una gama de técnicas de detección e identificación que comprende tinciones específicas, microscopía, cortes histológicos y microscopía electrónica dependiendo del tipo de parásito.

Muchas enfermedades son difíciles o imposibles de tratar. No todas son resultado directo de agentes infecciosos aunque alguno de éstos pueda estar involucrado. Los factores físicos o químicos y el manejo tienen, a menudo, fuerte influencia sobre el desarrollo de una condición patológica con resultado de pérdidas. Es necesario identificar dichas factores para tomar las medidas correctivas apropiadas. Sin embargo, cuando un brote de enfermedad se presenta, hay situaciones en que, además de corregir los factores que lo desencadenó, es indispensable la terapia química (Wood, 1968).

Los productos y formas de tratamiento empleados en nuestro país, son aplicados sin que exista una estandarización de dosis y duración de los tratamientos. Se corre así el riesgo de crear cepas resistentes. En un estudio realizado en salmónidos de cultivo de la Xa.Región (Informe CORFO-APSTCh, 1992), se encontró que muchas de las cepas aisladas resultaron resistentes a la mayoría de las drogas de uso común. Por lo general, el tratamiento sólo elimina temporalmente al patógeno, ya que la bacteria permanece y se vuelve a desarrollar si no se corrige el factor que contribuyó a su proliferación. Esto se relaciona con los métodos de prevención de enfermedades.

El tiempo ha demostrado que las técnicas de prevención de enfermedades son efectivas y ahorran considerable trabajo y dinero. Mientras algunos de los métodos de tratamiento para controlar enfermedades de peces han resultado exitosos, no hay sustituto para las prácticas cuidadosas y eficientes del cultivo (Wood, op.cit.).

Los criterios para estandarizar los métodos de prevención y tratamiento están basados en:

- 1.- La normativa vigente
- 2.- Dosis y frecuencia de los tratamientos
- 3.- Eficacia de los tratamientos
- 4.- Disponibilidad de productos farmacológicos.

El trabajo realizado en este aspecto queda contenido bajo la forma de dos manuales

"MANUAL DE METODOS DE DIAGNOSTICO  
PARA PATOGENOS DE SALMONIDOS"

y

"MANUAL DE PREVENCION Y TRATAMIENTO  
DE ENFERMEDADES DE SALMONIDOS DE CULTIVO"

## BIBLIOGRAFIA

- AMOS, KEVIN H., editor. 1985. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish Health Section, Amer. Fish. Soc. Corvallis, 144 pp.
- ANON, 1990. Report of the SOAFD Annual Survey of Fish Farm for 1990. SOAFD Mar. Lab., Aberdeen, 15 pp.
- BUSTOS P. 1994. Primer aislamiento de *Flexibacter psychrophilus*, como agente causal de "Rainbow Trout Fry Syndrome" (RTFS), originando mortalidades en trucha arcoiris en Chile. Seminario Internacional "Patología y Nutrición en el Desarrollo de la Acuicultura: Factores de Exito", Puerto Montt, Chile, Octubre 1994.
- COCHRAN, W.G., 1971. Técnicas de Muestreo. Cía. Edit. Continental S.A. (CECSA). México. 507pp.
- CORFO - Asociación de Productores de Salmones y Truchas Chile, 1989. Desarrollo de un sistema de control ictiopatólogico de salmónidos. Proyecto ejecutado por Universidad Austral de Chile y Universidad Católica de Valparaíso. Informe final: 106 pp.
- CORFO - Asociación de Productores de Salmones y Truchas Chile, 1992. Agentes bacterianos como patógenos de salmónidos y rol de los peces silvestres. Universidad Austral de Chile y Universidad Católica de Valparaíso. Informe final del Proyecto, 128 pp.
- CVITANICH J.D., O. GARATE y C.E. SMITH, 1991. The isolation of rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation and koch's postulate. J. Fish Diseases. 14: 121-145.
- FRYER J.L. 1989. Ictiopatología. Enfermedades de etiología Bacteriana y Viral en Salmonídeos. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Escuela de Post Grado. Santiago, 9 a 13 de Octubre, 182 pp.
- HERMAN, R.L. 1970. Prevention and control of fish diseases in hatcheries. *En*: A symposium on diseases of fishes and shellfishes. F. Snieszko (Ed.) Am.Fish.Soc.Special Publication 5: 3-15.

- INGLIS, V., R.J.ROBERTS y N.R.BROMAGE (Eds), (1993). Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publications.G.Brit., 312 pp.
- KENT, M.L. AND S.C.DAWE, 1993. Further evidences for a viral etiology in plasmacitoid leukemia of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 15(2): 115-121.
- KIMURA T., M.YOSHIMIZU and M.TANAKA, 1981. Studies on a New Virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-II. Oncogenic Nature Fish Pathology 15 (3/4): 149-153.
- KIMURA T., M.YOSHIMIZU and M.TANAKA, 1983. Susceptibility of Different Fry Stages of Representative Salmonid Species to *Oncorhynchus masou* virus (OMV). Fish Pathology 17 (4): 251-258.
- KINKELIN, P. Y R.P. HENDRICK. 1991. Dilemmas of disease control policies. Bull.Eur. Ass. Fish Pathol., 11(1): 3-7.
- KINKELIN P.de., C.MICHEL y P.GHITTINO. 1985. Tratado de las Enfermedades de los Peces. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza (España). 353 p.
- LANNAN, C.N., y J.L.FRYER. (1993), *Piscirickettsia salmonis*, a major pathogen of salmonid fish in Chile. Fish.Res.,17: 115-121.
- MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION. 1991. Ley General de Pesca y Acuicultura. Ley No. 18892 de 1989 y sus modificaciones. D.S. No.430 del 28 de septiembre de 1991.
- NEWBOUND G.C. AND M.L.KENT, 1991. Experimental interspecies transmission of plasmacitoid leukemia in salmonid fishes: Dis. Aquat. Org., 10(3): 159-166.
- REYES P. X., 1983. Rol de las enfermedades en el desarrollo de los cultivos de salmonídeos. Análisis de Pesquerías chilenas Patricio Arana (Ed). 237-242.
- REYES P. X., 1983. Enfermedades infecto-contagiosas y parasitarias de salmónidos de cultivo en Chile. Symp.Int.de Acuacult. Coquimbo, Chile, pp. 407-422.
- REYES P. X., 1985. Bases técnicas para la formulación de un control de cultivos de salmónidos. En: Estudios en Pesquerías Chilenas. T. Melo (Ed), 41-46.
- SNIESZKO, S.F. (1972). Progress in fish pathology in this century. Symposium of the Zoological Society of London. 30: 1-14.

- SNYDER B., 1971. Supplemental Report on Inland Freshwater Resources of Central Chile. UNDP/FAO. 35 pp.
- THOESSEN, J.C. (Ed.). 1994. Blue Book version 1. Suggested procedures for the detection and identification of certain fin fish and shellfish pathogens. 4th. Edition. Fish Health Section. American Fisheries Society.
- THOMPSON, S.K. 1990. Adaptative cluster sampling. J. Am. Stat. Assoc. 85: 1050-1059.
- TOLEDO M. S., M. TRONCOSO, D. P. PORTELL y G. FIGUEROA, 1992. Reporte de un brote de yersiniosis asociada a *Yersinia ruckeri* en salmónidos de cultivo. XV Congreso chileno de Microbiología, Valdivia, 9 a 12 de octubre, 1992.
- WOOD W., J. 1968. Diseases of Pacific Salmon, their prevention and treatment. State of Washington, Department of Fisheries. Hatchery Division. 82 pp.
- WOOD W., J. 1970. Introducción del Salmón del Pacífico en Chile, Informe al Servicio Agrícola y Ganadero, División de Pesca y Caza. 8pp.

ANEXO A

**FORMULARIOS DE ENCUESTA  
DIRIGIDOS A LOS CENTROS DE CULTIVO**

ENCUESTA N°

ENCUESTA A CENTROS DE CULTIVO DE SALMONIDOS  
AGUA DE MAR

---

I. ANTECEDENTES GENERALES DEL CENTRO DE CULTIVO.

I.1 Lugar en que está ubicado el Centro.

\_\_\_\_\_ COMUNA

\_\_\_\_\_ SECTOR

I.2 Procedencia de los peces de cada una de las especies que se cultivan en el Centro.

NOMBRE DE LA ESPECIE	LUGAR DE PROCEDENCIA (Sector-Región)

II. ACTIVIDADES GENERALES QUE SE REALIZAN EN EL CENTRO.

II.1 Periodicidad en el cambio de mallas de las Balsas-Jaulas.

Semanal  
Quincenal  
Otra

Especifique: \_\_\_\_\_

II.2 Frecuencia en la extracción de la mortalidad.

Diaria  
Semanal  
Otra frecuencia

Especifique: \_\_\_\_\_

II.3 Desinfectante(s) utilizado(s) en las aguas sangre de cosecha.

\_\_\_\_\_

II.4 Periodicidad en la medición de los parámetros ambientales que, habitualmente, registra el Centro para evaluar la calidad del agua en las Balsas-Jaulas.

PARAMETROS AMBIENTALES	FRECUENCIA EN LA MEDICION

II.5 Elementos de higiene con que cuenta el Centro.

Pediluvio  
Maniluvio  
Recipiente para  
desinfección de utensilios

II.6 Frecuencia con que el Centro recibe asistencia ictiopatólogica.

Mensual  
Semanal  
Quincenal  
Otra frecuencia  
Nunca

Especifique: \_\_\_\_\_

Salte a Item III. (Pág. 3)

II.7 Tipo de Institución que brinda asistencia ictiopatólogica al Centro.

- La propia empresa
- Laboratorios Universitarios
- Laboratorios particulares, no universitarios
- Laboratorios asociados a insumos
- Ninguna
- Otro tipo de institución


III. PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES DE SALMÓNIDOS QUE SE CULTIVAN EN EL CENTRO, RESPONDA LAS PREGUNTAS DEL ANEXO QUE SE ADJUNTA.

IV. COMENTARIOS GENERALES A LA ENCUESTA.

---

---

---

---

---

---

---

---

USO EXCLUSIVO DEL ENCUESTADOR

OCTUBRE DE 1994

ENCUESTA N°

A N E X O

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DEL CENTRO  
MANEJO Y CONTROL DE ENFERMEDADES

ESPECIE : \_\_\_\_\_

1.- Periodicidad en los recuentos y muestreo de peces.

	PERIODICIDAD				
	Nunca	Semanal	Quincenal	Monthly	Otra
MUESTREOS					
RECuentos					

2.- Tratamientos preventivos que normalmente, realizan en el Centro.

TRATAMIENTO PREVENTIVO	ETAPA DE CULTIVO EN QUE SE APLICA (*)
Uso de Inmunoestimulantes.	
Suplemento de Vitaminas/Minerales	
Disminución de Densidades.	
Uso de Antibióticos, vía oral.	
Inyección de Antibióticos.	
Otro. ESPECIFIQUE:	

(\*) En caso que el tratamiento no sea de uso habitual en el Centro, anote : NO SE REALIZA.

3.- Temperatura del agua asociada a los brotes de los principales patógenos que se han registrado en el Centro, durante el período 1992-1994, para la especie \_\_\_\_\_

FECHA Mes-AÑO	ENFERMEDADES REGISTRADAS EN EL CENTRO						
	BKD	ERE	Septicemia Bacteriana (%)	Leucemia viral	Myko- bacterias	Copépodos	Otras
01-92							
02-92							
03-92							
04-92							
05-92							
06-92							
07-92							
08-92							
09-92							
10-92							
11-92							
12-92							
(%) 1992							
01-93							
02-93							
03-93							
04-93							
05-93							
06-93							
07-93							
08-93							
09-93							
10-93							
11-93							
12-93							
(%) 1993							
01-94							
02-94							
03-94							
04-94							
05-94							
06-94							
07-94							
08-94							
09-94							
(%) 1994							

Para cada enfermedad, en el casillero correspondiente al mes de brote del patógeno, anote la temperatura del agua registrada al momento del brote.  
 (%) Este grupo incluye: PASTEURELA, AEROMONAS, PSEUDOMONAS, VIBRIOS.  
 (%%) En cada casillero de esta fila, anote el porcentaje de mortalidad en la especie, debido a la enfermedad, durante el año indicado.  
 SI LA ENFERMEDAD NO SE PRESENTÓ DURANTE ESE AÑO, ANOTE: N.S.P.

4.- Método de Diagnóstico y Tratamiento utilizado durante la última vez que se presentó la patología, dentro del periodo 1992-1994.

ENFERMEDAD	METODO DE DIAGNOSTICO (a)	TRATAMIENTO APLICADO (b)
BKD		
ERE		
Septicemia Bacteriana (S)		
Leucemia Viral		
Myxobacteria		
Copépodos		
Otra: (Indíquela)		

(S) Este grupo incluye: PASTEURELA, AEROMONAS, PSEUDOMONAS, VIBRIOS.  
 (a) En esta columna anote el número que se le asignó al Método, en el listado A.-  
 (b) En esta columna anote el número que se le asignó al Tratamiento en el listado B.-

A.- METODO DE DIAGNOSTICO:

1. FROTIS HUMEDO
2. TINCIÓN GRAM
3. BIOQUIMICO
4. INMUNODIFUSION
5. IFAT/DFAT
6. ELISA
7. ECP EN CULTIVO CELULAR
8. MICROSCOPIA ELECTRONICA
9. HISTOLOGIA
10. OTRO METODO:  
(Especifíquelo en el cuadro)

B.- TRATAMIENTO APLICADO:

- 1.- DISMINUCION DE DENSIDADES (Deadable)
- 2.- ACIDO OXOLINICO
- 3.- ERITROMICINA
- 4.- DIMETRIDAZOL
- 5.- FLUMEQUINA
- 6.- FURAZOLIDONA
- 7.- OXITETRACICLINA
- 8.- SULFAMETABINA O SULFADIMIDINA SODICA
- 9.- SULFADOXINA + TRIMETOPRIM
- 10.- OTRO TRATAMIENTO:  
(Especifíquelo en el cuadro)

5.- ¿Completó este ANEXO para cada una de las especies que se cultivan en el Centro?

NO  
 SI


Continúe respondiendo ANEXOS para las restantes especies que se cultivan en el Centro.  
 vuelva al ITEM IV (Pág. 8) de la ENCUESTA.

ENCUESTA N°

ENCUESTA A CENTROS DE CULTIVO DE SALMONIDOS  
AGUAS CONTINENTALES

I. - ANTECEDENTES GENERALES DEL CENTRO.

I.1 Lugar en que está ubicado el Centro.

\_\_\_\_\_ COMUNA \_\_\_\_\_ SECTOR

I.2 Instalaciones de cultivo con que cuenta el Centro.

Salas de Incubación  
Estanques de Alevinaje  
Balsas-Jaulas  
Otras instalaciones

Especifique: \_\_\_\_\_

I.3 Etapa de inicio del proceso productivo que desarrolla el Centro.

Ovas  
Alevines  
Pre-Smolt

Salte a ITEM III (Pág. 4)  
Salte a ITEM IV (Pág. 6)

I.4 Salas de Incubación donde se cultivan las ovas que son de propiedad del Centro.

Salas de Incubación del Centro  
Salas de Incubación de otros Centros

Indique los lugares en que están ubicados esos Centros:

II. - RESPONDA ESTE ITEM SOLO SI EL CENTRO POSEE SALAS DE INCUBACION;  
 EN CASO CONTRARIO, SALTE A ITEM III (Pág. 4).

II.1 Antecedentes Sanitarios de las ovas que se incuban en el Centro

- Ninguno
- Ovas certificadas libres de virus
- Reproductores sometidos a screening
- Reproductores tratados con antibióticos
- Otros


Especifique: \_\_\_\_\_

II.2 Origen de las ovas que se incuban en el Centro.

NOMBRE DE LA ESPECIE	ORIGEN DE LAS OVAS	
	De reproductores propios (#)	De reproductores de otros Centros (##)

(#) Anote lugar en que maduraron los reproductores.  
 (##) Anote lugar en que están ubicados dichos Centros.

II.3 Manejos preventivos que se aplican a las ovas.

- Ninguno
- Hidratación con yodóforo
- Desinfección con yodóforo
- Hidratación con antibióticos
- Otro.


Especifique: \_\_\_\_\_

II.4 Periodicidad en la medición de los parámetros ambientales que, habitualmente, registra el Centro para evaluar la calidad del agua utilizada en las Salas de Incubación.

PARAMETROS AMBIENTALES	FRECUENCIA EN LA MEDICION

II.5 Mortalidad debida a enfermedades que se han registrado durante el periodo 1992-1994, en las ovas que se incuban en el Centro.

ENFERMEDAD	AÑO EN QUE SE PRESENTO			No se registró brote
	1992 (*)	1993 (*)	1994 (*)	
Hongos				
Hydrocelle				
Otra. Indíquela:				

(\*) Para cada año, anote el Porcentaje de Mortalidad

II.6 Método de Diagnóstico y Tratamiento utilizado en cada patología, en la última vez que se presentó, durante el periodo 1992-1994.

ENFERMEDAD	METODO DE DIAGNOSTICO (a)	TRATAMIENTO APLICADO (b)
Hongos		
Hydrocelle		
Otra. Indíquela:		

(a) Anote el número asignado al Método, en el Listado A  
 (b) Anote el número asignado al Tratamiento en el Listado B

A. - METODO DE DIAGNOSTICO

1. - A SIMPLE VISTA
2. - BAJO LUPA
3. - FROTIS HUMEDO
4. - FROTIS TEÑIDO
5. - CULTIVO CELULAR
6. - METODO INMUNOLOGICO
7. - OTRO METODO  
(Especifíquelo en el Cuadro)

B. - TRATAMIENTO APLICADO

1. - ANTIBIOTICO
2. - SOLUCION SALINA
3. - VERDE MALAQUITA
4. - OTRO DESINFECTANTE  
(Especifíquelo en el Cuadro)

III. RESPONDA ESTE ITEM SOLO SI EL CENTRO POSEE ESTANQUES DE ALEVINAJE;  
EN CASO CONTRARIO, SALTE A ITEM IV (Pág.5).

III.1 Procedencia de los alevines de cada una de las especies que se  
cultivan en el Centro.

NOMBRE DE LA ESPECIE	LUGAR DE PROCEDENCIA (Sector-Región)

III.2 Periodicidad en la limpieza del agua de los estanques

Diaria  
Semanal  
Otra

Especifique: \_\_\_\_\_

III.3 Frecuencia en la extracción de la mortalidad.

ESPECIFIQUE: \_\_\_\_\_

III.4 Periodicidad en la medición de los parámetros ambientales que,  
habitualmente, registra el Centro para evaluar la calidad del  
agua en los Estanques de Alevinaje.

PARAMETROS AMBIENTALES	FRECUENCIA EN LA MEDICION

III.5 PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES DE ALEVINES QUE CULTIVA EL CENTRO  
RESPONDER ANEXO

IV. RESPONDA ESTE ITEM SOLO SI EL CENTRO POSEE BALSAS-JAULAS;  
 EN CASO CONTRARIO, SALTE A ITEM V (Pág.6).

IV.1 Procedencia del pre-smolt de cada una de las especies que se cultivan en el Centro.

NOMBRE DE LA ESPECIE	LUGAR DE PROCEDENCIA (Sector-Región)

IV.2 Periodicidad en el cambio de mallas.

Semanal  
 Quincenal  
 Otra


Especifique: \_\_\_\_\_

IV.3 Frecuencia en la acción de la mortalidad

Diaria  
 Dos veces por semana  
 Semanal  
 Otra frecuencia


Especifique: \_\_\_\_\_

IV.4 Desinfectante(s) utilizado(s) en las aguas sangre de cosecha.

---

IV.5 Periodicidad en la medición de los parámetros ambientales que, habitualmente, registra el Centro para evaluar la calidad del agua de las Balsas-Jaulas.

PARAMETROS AMBIENTALES	FRECUENCIA EN LA MEDICION

IV.6 PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES DE PRE-SMOLT QUE CULTIVA EL CENTRO, RESPONDER ANEXO.

V.- ACTIVIDADES GENERALES QUE SE REALIZAN EN EL CENTRO.

V.1. Presencia de elementos de higiene.

Pediluvio   
Maniluvio   
Rodiluvio

V.2. Desinfectantes utilizados en ropa y equipo.

Cloro   
Yodóforos   
Amonios cuaternarios   
Otro  Especifique: \_\_\_\_\_

V.3. Frecuencia con que el Centro recibe asistencia ictiopatólogica

Mensual   
Semanal   
Quincenal   
Otra   
Nunca  Especifique: \_\_\_\_\_  
Salte a Preg. V. 5. -

V.4. Institución que brinda asistencia ictiopatólogica al Centro.

La propia empresa   
Laboratorios Universitarios   
Laboratorios particulares, no universitarios   
Laboratorios asociados a insumos   
Otra institución

VI. COMENTARIOS GENERALES A LA ENCUESTA.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

USO EXCLUSIVO DEL ENCUESTADOR

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

OCTUBRE DE 1994

ENCUESTA N°

A N E X O

ACTIVIDADES ESPECIFICAS DEL CENTRO - MANEJO Y CONTROL DE ENFERMEDADES

ESPECIE :   
 ETAPA DE DESARROLLO:  Estanque de Alevinaje  
 Balsa - Jaula

1.- Periodicidad en los recuentos y muestreo de peces.

	PERIODICIDAD				
	Nunca	Semanal	Quincenal	Mensual	Otra
MUESTREOS					
RECuentos					

2.- Densidad de carga utilizada normalmente.

Hasta 5 [kg/m<sup>3</sup>]  
 De 5 a 10 [kg/m<sup>3</sup>]  
 De 10 a 15 [kg/m<sup>3</sup>]  
 De 15 a 20 [kg/m<sup>3</sup>]  
 De 20 a 25 [kg/m<sup>3</sup>]  
 Más de 25 [kg/m<sup>3</sup>]


3.- Tratamientos preventivos que, normalmente, realizan en el Centro.

TRATAMIENTO PREVENTIVO	ETAPA DE CULTIVO EN QUE SE APLICA (*)
Vacunación	
Suplemento de Vitaminas o Minerales	
Disminución de Densidades.	
Uso de Antibióticos	
Otro. ESPECIFIQUE:	

(\*) En caso que el tratamiento no sea de uso habitual en el Centro, anote: NO SE REALIZA.

4.- Temperatura del agua asociada a los brotes de los principales patógenos que se han registrado en el Centro, durante el periodo 1992-1994, para la especie \_\_\_\_\_

FECHA Mes-AÑO	ENFERMEDADES REGISTRADAS EN EL CENTRO									
	BKD	ERE	ERM	IPN	IHN	Leucemia Viral	Septic Bacte.	Hongos	ICH	Otras
01-92										
02-92										
03-92										
04-92										
05-92										
06-92										
07-92										
08-92										
09-92										
10-92										
11-92										
12-92										
( ) 1992										
01-93										
02-93										
03-93										
04-93										
05-93										
06-93										
07-93										
08-93										
09-93										
10-93										
11-93										
12-93										
( ) 1993										
01-94										
02-94										
03-94										
04-94										
05-94										
06-94										
07-94										
08-94										
09-94										
( ) 1994										

Para cada enfermedad, en el casillero correspondiente al mes de brote del patógeno, anote la temperatura del agua registrada al momento del brote.  
 ( ) Este grupo incluye: AEROMONAS, PSEUDOMONAS, MYXOBACTERIAS.  
 ( ) En cada casillero de esta fila, anote el porcentaje de mortalidad en la especie, debido a la enfermedad, durante el año indicado.  
 SI LA ENFERMEDAD NO SE PRESENTÓ DURANTE ESE AÑO, ANOTE: **N.S.P.**

5. - Método de Diagnóstico y Tratamiento utilizado durante la última vez que se presentó la patología, dentro del período 1992-1994.

ENFERMEDAD	METODO DE DIAGNOSTICO (a)	TRATAMIENTO APLICADO (b)
BKD		
ERS		
ERM		
IPN		
IHN		
Leucemia Viral		
Septicemia Bacter. (f)		
Hongos		
ICH		
Otra. Especifique:		

(f) Este grupo incluye:  
 AEROMONAS  
 PSEUDOMONAS  
 MYXOBACTERIAS.

(a) En esta columna anote el número que se le asignó al Método, en el listado A.-

(b) En esta columna anote el número que se le asignó al Tratamiento en el listado B.-

A. - METODO DE DIAGNOSTICO:

1. FROTIS HUMEDO
2. TINCION GRAM
3. BIOQUIMICO
4. INMUNODIFUSION
5. IFAT/DFAT
6. ELISA
7. ECP EN CULTIVO CELULAR
8. MICROSCOPIA ELECTRONICA
9. HISTOLOGIA
10. OTRO. Especifiquelo en el cuadro.

B. - TRATAMIENTO APLICADO:

1. - DISMINUCION DE DENSIDADES (Deadoble)
2. - ACIDO OXOLINICO
3. - ERITROMICINA
4. - DIMETRIDAZOL
5. - FLUMEQUINA
6. - FURAZOLIDONA
7. - OXITETRACICLINA
8. - SULFAMETAZINA O SULFADIMIDINA SODICA
9. - SULFADOXINA + TRIMETOPRIM
10. - OTRO. Especifiquelo en el cuadro.

5. - ¿Completó este ANEXO para cada una de las especies que se cultivan en el Centro?

NO  
 SI

Continúe respondiendo ANEXOS para las restantes especies que se cultivan en el Centro. vuelva al ITEM IV (Pág. 3) de la ENCUESTA.

ANEXO B

**FORMULARIOS DE ENCUESTA  
DIRIGIDOS A LOS LABORATORIOS DE  
ASISTENCIA ICTIOPATOLOGICA**

ENCUESTA N°

ENCUESTA A LABORATORIOS DE ASISTENCIA ICTIOPATOLOGICA

I. ANTECEDENTES GENERALES DEL LABORATORIO.

I.1 Clasifique el Laboratorio, según su Tipo, en alguna de las siguientes categorías.  
(Marque con una X lo que corresponda).

Asociado a Empresa de Cultivo  
Asociado a Insumos  
De Institución Universitaria  
De Institución Fiscal  
Privado, no asociado a Empresas  
Otro tipo. *Especifique:*

<input type="checkbox"/>

I.2 Indique la cantidad de personas que trabajan en el Laboratorio.

	N° de personas
NO PROFESIONALES	
PROFESIONALES CON ESTUDIOS SUPERIORES DE 8 SEMESTRES O MAS	
PROFESIONALES CON ESTUDIOS SUPERIORES DE MENOS DE 8 SEMESTRES	

I.3 Para cada uno de los profesionales del área ictiopatólogica que trabajan en el Laboratorio, indique profesión, años de experiencia en el área y antigüedad en el Laboratorio.

TITULO PROFESIONAL	EXPERIENCIA EN EL AREA	ANTIGÜEDAD EN EL LABORATORIO

I.4 Indique el o las áreas de desarrollo que más identifican a su Laboratorio.  
 (Marque con una X lo que corresponda).

AREA DE DESARROLLO	
Servicios	<input type="checkbox"/>
Investigación	<input type="checkbox"/>
Otra. Identifíquela:	<input type="checkbox"/>

I.5 Indique las líneas de trabajo que el Laboratorio desarrolla en forma preferencial.  
 (Marque con una X lo que corresponda).

LINEAS DE TRABAJO	AREAS DE DESARROLLO	
	Servicios	Investigación
Bacteriología	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Virología	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Parasitología	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otra. Especifique:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

I.6 Indique con qué periodicidad su Laboratorio ha recibido visita de expertos, durante el periodo 1992-1994.  
(Marque con una X lo que corresponda).

Nunca  
Ocasionalmente  
Una vez al año  
Dos veces al año  
Mensualmente  
Otra frecuencia. Especifique :

<input type="checkbox"/>

I.7 En el siguiente cuadro, registre la cantidad de personas del Laboratorio que han realizado actividades de perfeccionamiento durante el periodo 1992-1994.

AÑO	N° de personas
1992	
1993	
1994	

II. IDENTIFICACION DE PATOGENOS

II.1 Indique las técnicas que, actualmente, utiliza el Laboratorio para identificar cada uno de los agentes patológicos que se mencionan en el siguiente cuadro.

AGENTE PATOLOGICO	METODOS DE IDENTIFICACION (*)
IPNV	
IHNV	
RETROVIRUS	
SAPROLEGONIA	
ICH	
HEXEMITA	
ERGASILUS	
CALIGUS	
BKD	
ERS	
ERM	
AEROMONAS	
PSEUDOMONAS	
MIXOBACTERIAS	
VIBRIOS	
PASTEURELLA	
OTRO, Indíquelo:	

(\*) En cada caso, anote el o los números que correspondan, de acuerdo al listado A del ANEXO.

10.2 Para cada uno de los patógenos que ha aislado el Laboratorio durante el periodo 1992-1994, indique la etapa de desarrollo y especie de los peces diagnosticados (\*).

FECHA Mes-Año	AGENTES VIRALES Y PARASITARIOS DIAGNOSTICADOS POR EL LABORATORIO									
	IPN	IHN	Retro Virus	Otros Virus	ICH	Sapro- legnia	Caligue	Erga- sillus	Hexe- mita	Otros Parásit
01-92										
02-92										
03-92										
04-92										
05-92										
06-92										
07-92										
08-92										
09-92										
10-92										
11-92										
12-92										
01-93										
02-93										
03-93										
04-93										
05-93										
06-93										
07-93										
08-93										
09-93										
10-93										
11-93										
12-93										
01-94										
02-94										
03-94										
04-94										
05-94										
06-94										
07-94										
08-94										
09-94										
10-94										

(\*). Para cada patógeno aislado por el Laboratorio, en el casillero correspondiente al mes del diagnóstico, anote los códigos de los listados B y C del ANEXO (PAG 6) que representan a la etapa de desarrollo y especie de los peces, respectivamente.

FECHA Mes-Año	AGENTES BACTERIANOS DIAGNOSTICADOS POR EL LABORATORIO								
	BKD	SRS	ERM	Aero- monas	Pseudo- monas	Myxo- bacter.	Vibrio	Pasteu- rella	Otras bacter.
01-02									
02-02									
03-02									
04-02									
05-02									
06-02									
07-02									
08-02									
09-02									
10-02									
11-02									
12-02									
01-03									
02-03									
03-03									
04-03									
05-03									
06-03									
07-03									
08-03									
09-03									
10-03									
11-03									
12-03									
01-04									
02-04									
03-04									
04-04									
05-04									
06-04									
07-04									
08-04									
09-04									
10-04									

(\*) Para cada patógeno aislado por el Laboratorio, en el casillero correspondiente al mes del diagnóstico, anote los códigos de los listados B y C del ANEXO (PAG. 9) que representan a la etapa de desarrollo y especie de los peces, respectivamente.

II.3 Indique el equipamiento asociado a Identificación de Patógenos con que cuenta el Laboratorio.  
 (Marque con una X lo que corresponda).

CAMARAS ESTERILES	
CAMARAS DE FLUJO LAMINAR	
CENTRIFUJA REFRIGERADA	
CONGELADORES -70°C	
CONGELADOR DE NITROGENO PARA CELULAS	
EQUIPO HISTOLOGICO	
HOMOGENEIZADORES	
INCUBADORES	
KIT DE FILTRACION DE REACTIVOS Y MEDIOS LIQUIDOS	
MICROSCOPIO ELECTRONICO	
MICROSCOPIO EPIFLUORESCENCIA	
MICROSCOPIO OPTICO	
OTROS EQUIPOS. Especifique: _____	
_____	
_____	

II.4 Indique la procedencia de los principales insumos que utiliza el Laboratorio para la Identificación de Patógenos.

- Para los productos NACIONALES y los de IMPORTACION DIRECTA, anote el nombre del proveedor habitual.
- Para los productos de IMPORTACION INDIRECTA, anote el nombre del intermediario nacional.

INSUMOS	NACIONALES	DE IMPORTACION DIRECTA	DE IMPORTACION INDIRECTA
AMINOACIDOS			
ANTIBIOTICOS			
ANTICUERPOS MARCADOS			
ANTICUERPOS MONOCLONALES			
ANTICUERPOS POLICLONALES			
BATERIAS API			
BOTELLAS Y MICROPLACAS			
ENZIMAS			
KIT PARA ELISA			
LINEAS CELULARES			
MEDIOS DE CULTIVOS BACTERIANOS			
MEM			
SFB			
OTROS. Indiquelos: _____			
_____			

II.5 En el caso que su Laboratorio utilice productos importados que tienen su simil nacional, mencione la o las razones por las que no adquiere el producto nacional.

REFIERASE AL COSTO EN RELACION A LA CALIDAD DEL PRODUCTO Y A LA RAPIDEZ DE RESPUESTA DE PARTE DEL PROVEEDOR.

---

---

---

---

---

---

II.6 En el caso que su Laboratorio utilice productos nacionales mencione la o las razones por las que no adquiere un producto equivalente importado.

REFIERASE AL COSTO EN RELACION A LA CALIDAD DEL PRODUCTO Y A LA RAPIDEZ DE RESPUESTA DE PARTE DEL PROVEEDOR.

---

---

---

---

---

---

OBSERVACIONES DEL ENCUESTADOR:

---

---

---

---

A N E X O

A.- METODOS DE IDENTIFICACION

- 1.- BATERIA BIOQUIMICA
- 2.- API 20
- 3.- API E
- 4.- SENSIDIECOS
- 5.- TINCION GRAM
- 6.- AGLUTINACION
- 7.- INMUNODIFUSION
- 8.- ANTICUERPOS FLUORESCENTES (IFAT - DFAT)
- 9.- ELISA EN KITE
- 10.- ELISA CON LECTOR DE MICROPLACAS
- 11.- INMUNOELECTROFORESIS (IE)
- 12.- WESTERN BLOT
- 13.- EFECTO CITOPATOLOGICO (ECP)
- 14.- SERONEUTRALIZACION
- 15.- HISTOLOGIA
- 16.- MICROSCOPIA ELECTRONICA
- 17.- HEMATOLOGIA
- 18.- REACCION DE POLIMERACION EN CADENA (PCR)
- 19.- OTRO METODO. Indíquelo.

B.- ETAPAS DE DESARROLLO DE LOS PECES

- 1.- ALEVIN CON SACO
- 2.- ALEVIN
- 3.- PRE-EMOLT
- 4.- ADULTO
- 5.- REPRODUCTOR

C.- ESPECIE

- T.- TRUCHA
- S.- SALMON SALAR
- C.- SALMON CONO
- CH.- SALMON CHINOOK



FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA

**INFORMES TECNICOS F I P**

FIP - IT / 93 - 29

ANEXO I : MANUAL DE METODOS DE DIAGNOSTICO  
INFORME PARA PATOGENOS DE SALMONIDOS  
FINAL

UNIDAD : ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR  
EJECUTORA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO  
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR  
BASE PUERTO MONTT

MINISTERIO DE PLANIFICACION Y DESARROLLO  
CORPORACION DE FOMENTO DE LA PRODUCCION  
INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO  
DIRECCION ZONAL X Y XI REGIONES

# **MANUAL DE METODOS DE DIAGNOSTICO PARA PATOGENOS DE SALMONIDOS**

por

**Mariel Campalans B.**

**Patricia Rojas Z.**

**Raúl Castro D.**

1995

**ESTE MANUAL FORMA PARTE DEL PROGRAMA DE  
VIGILANCIA DE PATOLOGÍAS DE SALMONÍDEOS CULTIVADOS  
EN LA ZONA SUR AUSTRAL.**

**PROYECTO No.23; CODIGO FIP: 025-94-01**

**REQUIRENTE:** Fondo de Investigación Pesquera (FIP)

Convenio aprobado por Decreto Supremo N° 426 del 19 de agosto de 1994, del Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción.

**CONTRAPARTE:** Universidad Católica de Valparaíso  
Facultad de Recursos Naturales

**UNIDAD EJECUTORA:** Escuela de Ciencias del Mar  
Facultad de Recursos Naturales  
UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

**Instituto de Fomento Pesquero**  
Corporación de Fomento de la Producción  
MINISTERIO DE PLANIFICACION Y DESARROLLO

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:**

**Mariel Campalans Barnier.**  
Escuela de Ciencias del Mar  
San Cristóbal 563, PUERTO MONTT.

# MANUAL DE METODOS DE DIAGNOSTICO PARA PATOGENOS DE SALMONIDOS

## INTRODUCCION

El presente manual es una recopilación bibliográfica que reúne una gama de técnicas y procedimientos ampliamente usados en la detección de los principales agentes patógenos de peces. En este caso, ha sido enfocada a las patologías de salmónidos. La revisión presenta un estilo similar al del Fish Health Blue Book (Amos, 1985), mundialmente aceptado como manual de procedimientos para la detección e identificación de ciertos patógenos de peces. En aquellos casos que las técnicas no han presentado muchas variaciones en el tiempo, se ha transcrito los párrafos textualmente.

Para el diagnóstico inmunológico de enfermedades bacterianas se ha considerado trabajos presentados en reuniones de especialistas, revistas técnicas y textos especializados. En la sección sobre análisis específicos de enfermedades, sólo se han incluido aquellas señaladas en este trabajo como enfermedades de alto riesgo presentes en el país.

# 1. TOMA DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES DE NECROPSIA

## 1.1. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra, en una población asintomática, estará de acuerdo a un plan que proporcione un 95% de confianza de encontrar a un patógeno dado, asumiendo una prevalencia mínima de un 2%. El tamaño mínimo de muestra en cada inspección, basándose en el número de individuos que componen la población o lote, se detalla en el cuadro siguiente:

Tamaño población	Tamaño muestra 2% prevalencia	Tamaño muestra 5% prevalencia	Tamaño muestra 10% prevalencia
500	128	55	26
1000	138	57	27
1500	142	57	27
2000	143	58	27
4000	146	58	27
10000	147	58	27
100000 y >	148	58	30

Fuente: (Amos, 1985)

En poblaciones con síntomas, la obtención de la muestra estará basada en la elección de al menos 10 peces de una misma edad o lote, preferentemente enfermos o moribundos mayores de 4 cm.

## 1.2. Procedimientos de necropsia

Para el examen, tomar muestras solamente de lotes individuales de peces, cuidadosamente identificados (por especie, edad, origen), utilizando un tamaño de muestra que sea adecuado para detectar al agente infeccioso en estado portador o al nivel de probabilidad solicitado, (ver cuadro anterior).

Las muestras se deben tomar al azar, de cada estanque o lote. Se debe seleccionar primero los peces moribundos y luego completar el tamaño de la muestra con peces aparentemente sanos provenientes de todos los estanques que contengan al lote examinado en una proporción representativa.

Los análisis deben iniciarse dentro de las 6 horas después de la toma de muestra. Cuando ésto no sea posible, se deben mantener los peces en bolsas plásticas selladas y en hielo, debidamente rotuladas.

El procedimiento de necropsia supone que los mismos peces servirán para los análisis de parásitos, bacterias y virus. Se debe cuidar tomar primero las muestras de parásitos externos antes de proceder a abrir el pez en forma aséptica.

## 2. VIROLOGIA Y CULTIVOS CELULARES

### 2.1. Introducción

Las virosis representan un importante factor limitante en la salmonicultura, debido a la ausencia de medios terapéuticos para su control. El mayor avance en virología se hizo en la década de los 50's con el desarrollo de métodos para establecer y mantener células *in vitro*, útiles en la aislación y propagación de muchos agentes virales. Al final de esa década estas técnicas fueron aplicadas a la virología de peces. Muchos de los virus de peces aislados por estos procedimientos son importantes agentes de enfermedades (Fryer, 1989). El trabajo de Wolf publicado en 1988 es el libro de referencia sobre enfermedades virales de peces, en dicho libro se informa sobre 34 virus aislados y otros 25 que habían sido solo visualizados. Hetrick y Hedrick en 1992, describen 35 nuevos agentes descubiertos entre los años 1988 y 1992, estos autores anticipan que estos números podrían aumentar.

A pesar que en Chile existen informes sobre la aislación de algunos virus como IPN (McAllister y Reyes, 1984), no se ha informado de pérdidas económicas importantes lo que puede ser atribuido en parte a la reglamentación vigente en el país que exige la certificación libre de los virus más importantes de salmónidos.

Sin embargo, la importación de ovas constituye un riesgo sanitario permanente frente al cual el país debe estar preparado con el objeto de tomar las medidas de control y erradicación en la eventualidad que alguno de estos agente ingrese al país. Para tal efecto es importante conocer las técnicas de diagnóstico en uso que permitan realizar análisis de detección e identificación en las etapas que representan riesgos de introducción y diseminación y establecer medidas de control y erradicación.

## 2.2. Toma de muestras

- \* Para detectar agentes virales durante las epizootias se debe examinar un mínimo de 10 peces, en dos pools (de cinco peces cada uno). Los peces deben estar recién muertos o moribundos y exhibir signos clínicos típicos de la enfermedad.
- \* Cuando se analice la existencia de virus en peces asintomáticos, el muestreo estará de acuerdo con lo expuesto en el punto 1.1. Para las muestras de tejido y fluido ovárico o seminal la prevalencia mínima supuesta será del 2%, en este caso las muestras se reúnen en grupos de cinco peces con aproximadamente igual volumen de fluido aportado por cada pez.
  
- \* Muestrear en lotes, todas las poblaciones. Un lote se define como un grupo de peces de la misma especie y edad que comparten un mismo suministro de agua, y que se originaron de una población de reproductores discreta. Cuando se realicen inspecciones en pisciculturas, todos los lotes de peces deben ser muestreados.
- \* El examen de los tejidos estará de acuerdo con el siguiente esquema:
  - a. Alevines con saco vitelino: analizar los alevines enteros después de extraérseles el saco.
  - b. Peces hasta 5 cm: analizar el total de las vísceras, incluyendo el riñón.
  - c. Peces mayores de 5 cm: analizar solamente bazo y riñón.
  - d. Reproductores: usar fluido ovárico para la mayor cantidad de muestras que sea posible. Si se usan muestras de fluido seminal para completar el resto de la muestra requerida, no combinar fluidos ováricos y seminales de los mismos grupos. Si fuera posible, tomar muestras de riñón y bazo.
- \* Las muestras pueden ser combinadas para formar un pool, que contendrá un máximo de 5 peces.

### 2.3. Envío de muestras al laboratorio

1. Si las muestras no pueden analizarse inmediatamente o tienen que ser transportadas, se deben mantener refrigeradas a 4°C o con hielo (nunca congelar). No deben transcurrir más de 72 horas antes de ser inoculadas en células. Los mejores resultados se obtienen antes de las 48 horas.
2. Si las muestras deben ser transportadas o almacenadas, y el lapso excede las 12 horas, el medio de suspensión se amortiguará con solución salina (pH 7,0 a 7,8). Pueden usarse antibióticos para controlar el crecimiento de contaminantes microbianos. Sólo se usará gentamicina, micostatina, penicilina y estreptomina, a concentraciones no mayores a aquellas usadas para el procesamiento.
3. Si se trata de alevines pequeños, debe considerarse enviar los peces vivos al laboratorio, de acuerdo al procedimiento descrito para bacteriología.

### 2.4. Tratamiento de la muestra

1. Los tejidos deben ser homogenizados mediante un mortero, stomacher u otro triturador de tejidos, manteniendo la temperatura bajo los 15°C durante el proceso. Todo el equipo utilizado durante esta etapa debe ser esterilizado entre lotes, no siendo necesario cuando se trabaja con un solo lote.
2. Las muestras deben ser suspendidas en medio de cultivo celular tamponado (pH 7.0 a 7.8) y centrifugada a 2000xg (RCF) a 4° C por 10 minutos y luego tratada para retardar los contaminantes microbianos. Este proceso puede realizarse de acuerdo a los siguientes métodos:
  - a) Combinar el sobrenadante de las muestras con una solución de antibiótico en medio de cultivo celular, obteniendo una concentración final de 100-2000 ug/ml de gentamicina u 800 IU/ml de penicilina y 800 ug/ml de Estreptomina. Se

puede agregar Mycostatina o Fungizone obteniendo una concentración final de 400 IU/ml respectivamente. Incubar por 2 horas a 15° C o toda la noche a 4° C.

b) Como alternativa, se puede filtrar el sobrenadante a través de un filtro de membrana de 0,45 u.

3. La dilución final previa a la inoculación sobre los cultivos celulares no debe exceder de 1:100 (v/v). Las diluciones finales de las muestras de fluido ovárico o seminal no excederán 1:20 (v/v).
4. Los cultivos celulares inoculados serán incubados durante 14 días a 15° C.
5. Cuando se analicen virus en peces asintomáticos, y donde las circunstancias indiquen que existe la probabilidad de que la inoculación primaria de los cultivos celulares no pudiera resultar en la detección del virus, se aconseja realizar uno o dos pasajes ciegos. Un pasaje ciego se lleva a cabo extrayendo fluido de los cultivos celulares inoculados diluyendo 1:100 v/v con solución salina amortiguada e inoculando sobre cultivos celulares nuevos del mismo tipo que los utilizados para la primera inoculación.

## 2.5. Diagnóstico de las Enfermedades Virales

Debe comprenderse claramente que el aislamiento de un virus a partir de una muestra que manifieste enfermedad clínica no significa **per se**, que el virus haya causado la enfermedad. Sólo la correlación obtenida entre los hallazgos clínicos, histopatológicos y microbiológicos puede llevarnos a una conclusión sobre el agente causal.

## 2.6. CULTIVO DE CELULAS

Una de las técnicas que ha resultado tener mayor utilidad en el estudio de los virus es el cultivo de estos agentes en líneas celulares. Existen varios tipos de células: aquellas que se reproducen permanentemente, que provienen de tumores malignos, y aquellas que se mantienen

sólo durante un cierto número de ciclos y que, generalmente, corresponden a tejido embrionario. Todas ellas se pueden mantener congeladas en nitrógeno líquido durante meses o años.

En la Tabla I se presentan las distintas líneas celulares de uso más frecuente y sus respectivas sensibilidades a los virus.

**Tabla I.- Sensibilidad de las líneas celulares de peces a los virus.**

Línea Celular	Tejido y especie de origen	Sensibilidad a virus ( de > a < )
CHSE-214	Chinook salmon embryo	IPN / IHN / VHS / Herpes virus / OMV
CHSE-114	Chinook salmon embryo	IPN / IHN / VHS / Herpes virus / OMV
EPC	Epithelioma papillo- sum cyprini	IHN / VHS
RTG-2	Rainbow trout gonad	Herpes virus / IPN / VHS / OMV
FHM	Fathead minnow	IHN / VHS
BF	Bluegill fry	IHN / VHS

OMV : Retrovirus salmonis Tipo 2

### 2.7. Aislamiento del virus

Aislar un virus consiste en separarlo del tejido del huésped, cultivarlo en un cultivo de tejidos *in vitro* (como se ha descrito anteriormente), y ponerlo de manifiesto mediante una técnica adecuada. Cuando un virus infecta una célula, normalmente la destruye, liberando nuevos viriones. Durante este proceso, la morfología básica de las células se modifica, produciendo una diversidad de efectos citopáticos (ECP). Por ejemplo, en el caso del IPN (Necrosis Pancreática

Infeciosa), las células infectadas conservan su forma alargada característica, mientras que en el caso de la **Enfermedad de Egtved** (septicemia hemorrágica viral) las células se vuelven esféricas antes de necrosarse. Las inclusiones son, muchas veces, características de las células infectadas por un virus. Ciertos virus producen alteraciones en el núcleo o en el citoplasma que se manifiestan por una coloración diferente del resto de la célula y representan acumulaciones de proteínas víricas, detritus celulares o restos de los lugares de replicación. De manera general, los herpesvirus y los adenovirus producen inclusiones citoplasmáticas. Las inclusiones más evidentes, producidas por los virus de los peces, son aquellas que se encuentran en el citoplasma de los fibroblastos infectados por el virus de la enfermedad linfocítica.

## 2.8. Control de calidad de los cultivos celulares

Se tendrán presente las siguientes consideraciones:

1. Para todos los ensayos virales se usarán células susceptibles, de apariencia normal y rápida división. Para la inoculación de muestras se prefieren células de menos de 72 horas de edad y confluentes en un 80 a 90%. Se recomienda la utilización de dos líneas celulares para cada prueba con el fin de incrementar la probabilidad de aislamiento viral.
2. Todos los stocks de cultivos celulares usados para los ensayos virales deben ser probados a intervalos de tres meses para advertir la eventual presencia de **Mycoplasma** spp. Las pruebas pueden hacerse en laboratorios calificados comerciales o universitarios.
3. Pueden obtenerse nuevos stocks celulares de la American Type Culture Collection (ATCC) u otras fuentes certificadas de células libres de Mycoplasma.
4. Todos los componentes de los medios que no sean esterilizados en autoclave deben probarse y ser encontrados libres de **Mycoplasma** spp. y de factores inhibidores del crecimiento celular y/o de la replicación viral. Los sueros certificados libres de **Mycoplasma** spp. y otros reactivos certificados no necesitan ser probados.
5. Para el trabajo de rutina con cultivos celulares solamente se permite penicilina (100 UI/ml) - estreptomycin (100 µg/ml) o gentamicina (100 µg/ml) y micostacina (25 mg/ml).

## 2.9. Control de los análisis virales

1. El control positivo debe demostrar que las células son sensibles a todos los virus de peces que sean analizados. Si ésto no fuera posible, las células deben enviarse periódicamente a un laboratorio para reafirmar su sensibilidad a los virus de interés.
2. La sensibilidad será definida como la habilidad de las células de mostrar efectos citopáticos (ECP) cuando son expuestas a una suspensión del virus de  $10^2$  de TCID<sub>50</sub> /ml o equivalente.
3. En cada ensayo viral deben incubarse controles no inoculados y negativos (inoculados con solución salina estéril o con tejido de peces que se sabe no está infectado). Estos controles deben permanecer libres de ECP durante todo el período de incubación.

## 2.10. Identificación de Virus por Seroneutralización

1. Seleccionar cultivos celulares que muestren un ECP viral típico y diluir fluido de ellos hasta 1:1000 y 1:100.000 .
2. Diluir apropiadamente el suero de control (que no contiene anticuerpos contra los virus de los peces) y el antisuero específico (que contiene anticuerpos contra un cierto virus). Generalmente, el proveedor del suero brindará la información sobre la dilución, pero si ella no se encontrara disponible, diluir el suero con solución salina amortiguada (pH 7,9 - 7,8).
3. Mezclar porciones iguales de fluido diluido del cultivo celular del paso 1 y del antisuero diluido del paso 2.
4. Mezclar porciones iguales de fluido diluido del cultivo celular del paso 1 y del suero control diluido del paso 2.
5. Repetir los pasos 3 y 4 pero usando un virus de referencia conocido (suspensión conteniendo 500 TCID<sub>50</sub>/ml) en lugar del fluido diluido de cultivos con sospecha de virus del paso 1.

6. Mantener todas las mezclas a una temperatura de inoculación adecuada durante 60 minutos, agitando cada tubo a intervalos de 15 minutos.
7. Inocular una cantidad apropiada (Tabla II) de cada mezcla sobre pares de cultivos celulares. Para la prueba de neutralización debe usarse la misma línea celular usada para el aislamiento primario del agente. Dos cultivos celulares deben inocularse con antisuero diluido hasta tener una dilución equivalente a la muestra de prueba antisuero. Este control de suero identifica la toxicidad del suero. Deben incluirse dos cultivos celulares no inoculados como controles celulares normales.
8. Incubar todos los cultivos durante 2 a 12 días, dependiendo del agente viral, a la misma temperatura usada para el aislamiento primario.

**Tabla II.- Inoculación sugerida para varios recipientes de cultivo.**

Contenedor	Volumen de la muestra	Volumen Final
Botella 175	5 ml	30 ml
Botella 25	1 ml	5ml
Tubo fondo plano	0.5 ml	1 ml
96 pocillos	0.05 ml	0.1 ml
24 pocillos	0.25 ml	1 ml
6 pocillos	1 ml	3 ml

La aparición de ECP en los cultivos inoculados con la mezcla suero de control-virus pero no en los cultivos inoculados con la mezcla antisuero-virus identifica al agente como relacionado con el virus usado para la producción del antisuero. Los cultivos celulares deben ser observados diariamente.

## 2.11. Otros Métodos para identificación de virus.

Existen diversos test inmunológicos más específicos que la seroneutralización, los que han sido utilizados para diferentes agentes virales: inmunofluorescencia, ELISA, inmunoblot, etc.. Todos ellos pueden ser muy prácticos y útiles en algunas situaciones.

### 3. BACTERIOLOGIA: Procedimientos de detección e identificación.

#### 3.1. Introducción

El diagnóstico bacteriológico de peces es básicamente similar al de los animales superiores incluido el hombre, aunque muchos, del amplio rango de patógenos potenciales son de géneros no familiares a la microbiología clínica o veterinaria. Quizás las diferencias más importantes radiquen en que las patologías en peces no están tan bien conocidas y por lo tanto, de la descripción de la sintomatología, se obtiene un grado menor de información que en las enfermedades de mamíferos y aves.

El aislamiento e interpretación de resultados también presenta problemas debido a las características del ambiente acuático, el cual frecuentemente tiene su propia flora microbiana, y a la íntima relación entre la fisiología de un poiquiloterma y su ambiente. Un número significativo de enfermedades bacterianas de peces involucran microorganismos que son componentes de la flora normal del intestino o integumentaria, la cual sólo se hace patógena bajo la influencia de cambios ambientales tales como una rápida alteración de temperatura, contaminación, o stress dietario u hormonal. Es así como la atención que se preste a la historia clínica es condición *sine qua non* de un diagnóstico racional.

Por otra parte, en lo que se refiere a la metodología empleada para la identificación del patógeno, se utilizan los mismos métodos que para la determinación de patógenos de animales superiores, si bien no se dispone aún de la diversidad de reactivos comerciales que encontramos en el diagnóstico de enfermedades de mamíferos y aves de interés económico.

### 3.2. Toma de muestras

- \* Examinar y registrar los signos externos de branquias, piel, ojos y boca.
- \* Limpiar y abrir los peces en forma aséptica.
- \* El material procedente de lesiones externas e internas y las muestras de riñón se siembran en placas con diferentes medios de cultivo.
- \* Si los peces son de tamaño menor de 4 cm, una vez abiertos se eliminan las vísceras, dejando intacto el riñón, y se realiza un homogenizado del resto del pez en solución salina estéril previo a la siembra en los diferentes medios.

En los peces de tamaño mayor, el material procedente de lesiones externas e internas y las muestras de riñón se siembran en placas con los medios de cultivo.

- \* Se pueden emplear una variedad de medios a elección del laboratorio que realice los análisis, pero los medios que básicamente se deben usar para aislamientos primarios son:

- TSA (Agar de Soya Tróptica)
- TSA + NaCl (para muestras de peces marinos)
- Agar SHIEH o Cytophaga
- KDM-C o KDM-2 (incubar a 15° C por mínimo 15 días)

En el Apéndice 1 de este manual, se describe la preparación de estos medios. Las siembras en los diferentes medios se incuban a 20° C, y se observa si existe crecimiento durante 5 días, antes de ser eliminadas. En el caso de los medios KDM-C o KDM-2 se incuban por 15 días. Los crecimientos de colonias, obtenidos de las siembras se analizan bioquímicamente para identificar las bacterias.

- \* Una vez realizadas las siembras, se procede a hacer frotis de riñón, lesiones externas, branquias y sangre, para su posterior observación al microscopio. Los

frotis se tiñen utilizando tinción Gram y se observa bajo microscopio óptico un mínimo de 50 campos con aumento 900 a 1000x.

En el caso de riñón, si se detectan diplobacilos Gram (+) extra e intercelulares, podría ser indicativo de la presencia de **Renibacterium salmoninarum**, por lo tanto es conveniente realizar los frotis en duplicado y guardar un trozo de tejido renal para comprobarlo mediante otros métodos.

- \* Paralelamente a la siembra en los medios, se deben realizar frotis del riñón, lesiones externas, branquias y sangre, para su posterior observación al microscopio.
- \* Si se observan lesiones tuberculosas o granulomatosas (en los órganos), se debe obtener frotis de estas lesiones y teñirlos por el método Ziehl-Nielsen.

Las técnicas de tinciones de Gram y Ziehl-Nielsen así como las soluciones que se emplean, se describen en el apéndice 1 de este Anexo.

### 3.3. Envío de muestras al laboratorio

- \* Una posibilidad es enviar los peces vivos (si se trata de alevines pequeños), en una bolsa plástica con suficiente aire, y recubierta con hielo, en una caja térmica.
- \* Si no se puede optar por la posibilidad anterior, pueden mantenerse las muestras refrigeradas (4°C), y trasladarlas dentro de bolsas plásticas nuevas (sin uso), cubiertas con hielo, en una caja térmica. Se debe tenerse presente que los exámenes en la muestra fresca o refrigerada, deben comenzar dentro de 6 horas después de haberse tomado.

### 3.4. Procedimientos de detección e identificación

#### 3.4.1. Técnicas bioquímicas

##### \* Generalidades

Para diferenciar las colonias que han crecido en las placas se toman en cuenta las características bioquímicas. El uso de medios selectivos facilita el aislamiento, aunque un diagnóstico definitivo considera una caracterización bioquímica.

Las colonias amarillo-rizoides que han crecido en las placas SHIEH y Agar Citófaga se aíslan y se les hace un frotis para tinción Gram. Si se observan bacilos Gram negativos, alargados y delgados y con motilidad positiva, se puede suponer una infección Myxobacteriana. Para confirmar este diagnóstico se debe seguir el procedimiento bioquímico.

Para la siembra en los diferentes medios determinativos, se toma con el asa de nicromo, esterilizada al calor, una cantidad apropiada de bacterias desde una colonia pura y se siembra por estrias la superficie de la placa o del tubo de agar inclinado. Para las siembras en profundidad, se utiliza un asa recta que se introduce en picadura en el medio empleado.

##### \* Tinción Gram

- **Patógenos Gram positivos:** Las bacterias Gram positivas son habitualmente más fáciles de reconocer. Su morfología permite la determinación de casi la mayor parte de las especies, y hasta en el caso de la enfermedad de riñón por *Renibacterium salmoninarum*, que es extremadamente difícil de cultivar, el examen morfológico ha sido hasta hace poco la única técnica de diagnóstico. Se ha

descrito una clave (Bullock, 1971) para determinar las bacterias Gram positivas basada únicamente en las características morfológicas de los gérmenes encontrados en los frotis teñidos, aunque la identificación de especies como *Mycobacterium* o *Streptococcus* exige su aislamiento y estudios bioquímicos.

- **Patógenos Gram Negativos:** Las bacterias Gram negativas pueden clasificarse, en general en dos grupos: Las Flexibacterias (filamentosas, largas y delgadas) y los bacilos (mas cortos). Las primeras pueden aislarse en Agar de Citofaga o Shieh, en donde producen generalmente colonias coloreadas, mientras que los métodos normales de identificación de los bacilos cortos Gram negativos consisten en el empleo de Tripticasa Soya Agar (TSA), para un primer aislamiento.

Como procedimiento general, el siguiente paso lo constituyen las pruebas de caracterización bioquímica de las bacterias en medios determinativos. Estas se exponen en las Tablas III a VII.

Tabla III. Caracteres distintivos de Citofagáceos y Flavobacteriáceos.

CARACTERES	E S P E C I E S		
	<i>Flexibacter columnaris</i>	<i>Cytophaga psychrophila</i>	<i>Flavobacterium branchiophila</i>
Cultivo a 25°C	+	-	+
Cultivo en NaCl al 0.4%	variable	+	-
Pigmento amarillo	+	+	+
Oxidasa	+	-	+
Glucosa	variable	-	+
H <sub>2</sub> S	+	-	-
Celulosa	-	+	-
Almidón	-	-	+

Fuente: Kinkelin et al., 1985

Tabla IV. Distinción de gérmenes aerobios Gram-negativos de mayor frecuencia en peces.

CARACTERES	E S P E C I E S	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticum</i>
Pigmento insoluble fluorescente	-	-
Movilidad	variable	-
Crecimiento a 41°C	-	-
Oxidasa	+	-
Acido en glucosa	+	variable
H <sub>2</sub> S en Kliger	-	-
ADH	+	+
Desnitrificación	variable	-

Fuente: Kinkelin et al., 1985

Tabla V.- Caracteres distintivos de las enterobacterias más frecuentes en peces.

CARACTER	ESPECIES			
	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
Movilidad a 22°C a 37°C	+ (ex) + (ex)	+ (ex) + (ex)	+ variable	+ -
Gas en glucosa a 22°C a 37°C	+ (ex) + (ex)	+ +	- variable	- -
ONPG	+	-	variable	+
LDC	-	+	+	+
ODC	variable	+	+	+
Citrato de Simmons	+ (ex)	-	+	variable
H <sub>2</sub> S	+ (ex)	-	variable	-
Ureasa	variable	-	-	-
Indol	- (ex)	+	-	-
VP	-	-	+ (ex)	variable
Gelatina	-	-	-	variable
Manitol	+	- (ex)	+	+
Inositol	variable	-	-	-
Sorbitol	+ (ex)	-	-	variable
Ramnosa	+	-	+ (ex)	-
Sacarosa	variable	-	variable	-
Melobiosa	variable	-	-	-
Amigdalina	variable	-	- (ex)	-
Arabinosa	+	-	+	-

(ex) = posibles excepciones  
Fuente: Kinkelin et al., 1985

Tabla VI.- Caracteres distintivos de aeromonas frecuentes en peces.

CARACTER	ESPECIES					
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>salmonicida</i>	<i>masoucida</i>	<i>atípico</i>
Crecimiento a 37°C	+	+	+	-	-	-
Pigmento marrón soluble	-	-	-	+	variable	-
Movilidad	+	+	+	-	-	-
Nitrato reductasa	+	+	+	+	+	variable
Gas en glucosa	+	-	variable	+	+	-(ex)
ONPG	+	+	+	+	+	variable
ADH	+	+	+	+	+	variable
LDC	-(ex)	-(ex)	-(ex)	-	+	variable
Citrato de Simmons	variable	variable	variable	-	-	-
H <sub>2</sub> S en GCF	+	-	+	-	+	-
Indol	+	+	+	-	+	variable
VP	+	-	variable	-	+	variable
Gelatina	+	+	+	+	+	variable
Manitol	+	+	+	+	+	variable
Sacarosa	+(ex)	+(ex)	+(ex)	+(ex)	+	variable
Melobiosa	-	-	-	+	-	variable
Esculina	+	+	-	+	+	variable
Saculina	+	+	-	variable	variable	variable
Crecimiento en M70						
* Arabinosa	+	+	-	+	+	
* Salicina	+	+	-			
* Arginina	+	+	-	-	-	
* Histidina	+	+	-	-	-	

(ex) = posibles excepciones

Fuente: Kinkelin et al., 1985

Tabla VII.- Vibrionáceos marinos y pasteurellas.

CARACTER	ESPECIES						
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio ordalii</i>	<i>Pasteurella piscicola</i>	<i>Pasteurella plecoglosacida</i>
Crecimiento a 37°C	-	-	-	-	-	-	-
Luminiscencia	+	+	+	+(ex)	-	-	+
Movilidad	+	+	+	+	+	-	-
Reducción de NO <sub>3</sub>	+	+	+	+	-(ex)	-(ex)	-
Gas en glucosa	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	+	+	-	-	-
ADH	-	-	-	+	-	+(ex)	-
LDC	+	+	+	-	-	-	-
Citrato de Simmons	+	+	variable	+(ex)	-	-(ex)	
Ureasa	-	-	-	-	-	-	
Indol	+		+	+	+	-	-
VP	+	-(ex)	-	+	-	-(ex)	
Gelatina	+	+	+	+	+(ex)	-(ex)	-
Manitol	+	+	variable	+	+	-(ex)	-
Sorbirtol	-(ex)	-	-	+	-	-(ex)	
Ramnosa	-	-(ex)	-	-	-	variable	-
Sacarosa	+	-	-	+	+	-(ex)	+
Amigdalina	-	-		+	-	-	
Arabinosa	-	+(ex)	-	variable	-	-	-

(ex) = posibles excepciones

Fuente: Kinkelin et al., 1985

\* **Sistema API 20E**

En forma relativamente reciente, está en el mercado chileno un sistema simplificado de baterías de análisis bacteriano. Es el sistema API 20E, una versión estandarizada, miniaturizada de los procedimientos convencionales para la identificación de Enterobacteriaceae y otras bacterias Gram negativas.

El sistema API 20E consiste de microtubos que contienen sustratos deshidratados, los que son reconstituídos agregando una suspensión bacteriana.

En seguida, se incuba para que los microorganismos reaccionen con el contenido de los tubos y se lee cuando los diferentes sistemas indicadores son afectados por los metabolitos o los reactivos agregados, generalmente después de 18 - 24 hrs incubando a 35 - 37°C. En el caso de peces, se recomienda incubar a 22°C.

El sistema API-20 tiene procedimientos para identificar el mismo día y entre 18 y 24 hrs las Enterobacteriaceae así como para identificar a las 18 - 24 hrs y 36 - 48 hrs otras bacterias Gram negativas. Para algunos casos la bacteria identificada debe confirmarse mediante serología.

### **3.4.2. Técnicas Inmunológicas**

El diagnóstico presunto obtenido para la identificación de las bacterias a través de las pruebas bioquímicas es confirmado en ocasiones por métodos inmunológicos. Mediante la aplicación de estas pruebas se logra un diagnóstico positivo o confirmatorio del patógeno.

Algunas técnicas inmunológicas que han sido desarrolladas o adaptadas para la detección de patógenos en peces son:

- Test de Aglutinación Bacteriana
- Técnica del Anticuerpo Fluorescente (IFAT)
- Técnica Inmunoenzimática (ELISA)

## -TEST DE LA AGLUTINACIÓN BACTERIANA

Las reacciones de aglutinación están entre las pruebas inmunológicas más fáciles de realizar, siendo útiles para confirmar la identidad de la mayoría de los agentes bacterianos patógenos de peces. El procedimiento es el siguiente:

1. Resuspender una o más colonias bacterianas en una pequeña cantidad de solución salina la que puede contener 1,5% de fenol como desinfectante. La suspensión debe ser lo suficientemente densa (color lechoso).
2. En un portaobjetos con escavaciones se coloca una pequeña gota de suspensión de bacterias y como control negativo colocar una suspensión de otras bacterias.
3. Se añade una gota de antisuero diluido 1:10 a cada suspensión de bacterias y mezclando suavemente y se incuba a temperatura ambiente.
4. Se examina macroscópicamente a varios intervalos para observar la reacción.
5. El resultado puede ser examinado con poco aumento microscópico. Generalmente se registra el tiempo de aglutinación visible. Una aglutinación fuerte debería ocurrir dentro de 5 minutos.
6. Los resultados pueden ser registrados de la siguiente forma:

aglutinación completa =	++++
aglutinación fuerte =	+++
aglutinación moderada =	++
aglutinación leve =	+
no aglutinación =	-

## -TECNICA INDIRECTA DEL ANTICUERPO FLUORESCENTE. (IFAT).

### Consideraciones

Esta técnica se prefiere a la directa (FAT) por su mayor versatilidad y sensibilidad. Tiene la ventaja de que el anticuerpo marcado puede obtenerse comercialmente, evitando los procedimientos de conjugación y es más sensible que la técnica directa.

Se emplean dos anticuerpos, uno anti-Antígeno y otro marcado con fluoresceína anti el primer anticuerpo. Normalmente el primer anticuerpo es de conejo y el segundo (fluorescente) de cabra anticonejo.

El siguiente protocolo asume que se están usando las diluciones correctas de los reactivos, éstas deben ser establecidas por el laboratorio probando una serie de diluciones de ambos anticuerpos, con frotis positivos, y observando la calidad de la fluorescencia.

### Procedimiento:

1. Preparar los frotis de la muestra en portaobjetos limpios.
2. Secar con calor o fijar por 5 minutos en metanol.
3. Añadir una gota de Antisuero de conejo no marcado para el antígeno deseado, incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Lavar los portaobjetos con PBS (pH 7,2) y colocarlos en un baño de PBS por 5 minutos.
5. Eliminar el exceso de PBS y añadir el antisuero anticonejo de cabra marcado.
6. Incubar de nuevo y lavar como antes.
7. Añadir el fluido de montaje (pH 9) directamente sobre la muestra, colocar un cubreobjeto sobre la muestra y añadir sobre éste, aceite de inmersión.
8. Se examina un mínimo de 50 campos en un microscopio de epifluorescencia. El diagnóstico positivo revela una bacteria verde brillante.
9. Usar controles positivos y negativos.

## - TÉCNICA INMUNOENZIMÁTICA (ELISA)

Los enzimoimmunoensayos (E.I.A.) utilizan enzimas como marcadores que pueden unirse a antígenos o anticuerpos en forma tal que los conjugados resultantes conservan tanto la actividad enzimática como la inmunológica.

El EIA heterogéneo que posee más de una fase es conocido comúnmente como ELISA (enzyme linked immunosorbent assay = enzima ligada a un inmunoabsorbente). Se basa en que el antígeno o anticuerpo se inmoviliza en una superficie sólida de soporte para permitir la fijación del reactivo marcado que reaccionó y la elusión de aquel que no lo ha hecho. La degradación enzimática de un sustrato cromógeno produce un factor de amplificación que facilita la detección sensible y precisa la presencia de la enzima fijada a la fase sólida. La técnica ELISA tiene aplicaciones universales ya que puede utilizarse para detectar haptenos, antígenos o anticuerpos implicados en enfermedades infecciosas y no infecciosas.

### Ventajas:

- + Los reactivos marcados con enzima son de alta estabilidad, por lo tanto, pueden conservarse por largo tiempo.
- + Permite una completa automatización del sistema.
- + Los resultados son de naturaleza cuantitativa.
- + Los antígenos y anticuerpos marcados con enzima pueden ser manejados en condiciones normales de laboratorio.

### Desventajas:

- El costo de las microplacas (de usarse éstas como fase sólida).
- La diferente afinidad de los antígenos para adherirse a la fase sólida.
- La presencia de reacciones no específicas.
- Pérdida de la actividad del anticuerpo después del marcado con enzima.

En general, los ensayos competitivos representan el inconveniente de que la incubación de los antígenos o anticuerpos marcados con enzima debe realizarse con las muestras problema (suero, extractos tisulares, secreciones, etc.). Estas soluciones pueden contener sustancias que

alteren la actividad enzimática de la reacción, problema que se elimina con los ensayos no competitivos donde la incubación de la muestra problema es separada de la del antígeno o anticuerpo marcado con enzima. Además, las técnicas ELISA no competitivos tienen otras ventajas, como el uso de un anticuerpo antiespecie marcado, para medición de distintos antígenos o anticuerpos y su mayor sensibilidad, Melendez et al., 1987.

#### **Consideraciones ( Stolen et al., 1990)**

1. Previo a desarrollar la técnica se debe producir un pool de anticuerpo específico contra el antígeno de interés, el cual puede encontrarse en forma comercial como es el caso de *Renibacterium salmoninarum*.
2. Generalmente el antisuero estandar es un pool de suero de alto título obtenido de un grupo numeroso de peces.
3. Este pool debe ser parcelado en alícuotas en tubos pequeños para evitar continuos congelamientos del estándar y almacenarlos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
4. De preferencia el pool debe ser generado de la misma especie de peces del que se analizaran las muestras.

#### **Técnica ELISA sandwich:**

Es la técnica inmunoenzimática de uso más generalizado por su alta sensibilidad y porque se puede emplear cuando el antígeno está rodeado de otros componentes.

Etapas:

#### **Adsorción a la placa del antígeno (fase sólida).**

1. Adsorber las paredes de los pocillos de la placa ELISA con 100  $\mu\text{l}$  de una solución de TNP-BSA al 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diluido en buffer de adsorción, como describe Stolen et. al, 1990. Cubrir la placa con parafilm e incubar por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda o toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad.
2. Remover la solución de adsorción de la placa ELISA invirtiéndola, el exceso de solución se elimina golpeando suavemente la placa en una toalla de papel.
3. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de buffer de bloqueo por orificio para prevenir la adsorción no específica de muestras de suero o conjugados en la superficie de la placa ELISA.

4. Incubar la placa recubierta en una cámara húmeda a 37°C por 30 minutos.
5. Remover la solución de bloqueo como se describe en el paso 2 y proceder a lavar los pocillos.
6. Lavar 6 veces, 3 veces con TTBS seguidos por 3 lavados separados con TBS, Se puede usar una piseta si no se dispone de una lavadora automática de placas. Cada pocillo debe ser completamente inundado durante los 6 lavados después de cada lavado remover la solución sacudiendo la placa sobre el desagüe.
7. Coloque la placa ELISA invertida sobre toallas de papel al final de los 6 lavados para remover cualquier humedad que permanezca en las paredes.

#### **Estandarización del antisuero**

El antisuero estandar debe ser corrido sobre cada placa para normalización de los datos obtenidos por las muestras analizadas en esa placa. Este procedimiento asegura que los datos obtenidos en una placa son comparables a los datos obtenidos en las otras placas, este estandar es usado además para determinar la concentración relativa de la actividad del anticuerpo/ $\mu\text{l}$  de muestra.

Antes del análisis de las muestras, éstas son tituladas para determinar el rango de dilución para el estandar y un valor para su actividad.

#### **Adición de las muestras problemas**

1. Añadir las diluciones del estandar y de las muestras a la placa Elisa en triplicado. A los últimos tres pocillos de la placa añadir 100  $\mu\text{l}$  de solución al 3% BSA-TTBS los que serán usados como blanco (BSA Bovine Serum Albumin, Sigma). Esto permite la determinación de la densidad óptica de referencia, la cual subsecuentemente puede ser sustraída de los otros pocillos.
2. Una vez diluidas las muestras serán añadidas a la placa, la placa cubierta se incuba en una cámara húmeda a 17°C por 1,5 horas. Esta temperatura es considerada el óptimo para las reacciones de los anticuerpos de salmónidos.
3. Remover el suero desde la placa, lavar y secar como en los pasos anteriores.

### Adición de la enzima marcada

Se añade a cada pocillo 100  $\mu$ l de la dilución óptima del anti-cuerpo anti-pez, el cual ha sido marcado. En este paso se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales.

1. Añadir 100  $\mu$ l de conjugado al blanco. Incubar la placa cubierta en cámara húmeda por una hora a temperatura ambiente.
2. Remover el anticuerpo conjugado de la placa, lavar y secar dando golpecitos con la placa invertida, sobre toalla de papel.
3. Adicionar 100  $\mu$ l de Streptavidin-HRPO en dilución 1/100 en una solución 3% de BSA T-TBS a cada pocillo.
4. Incubar la placa cubierta en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Remover el conjugado de enzima de la placa, lavar 6 veces con TTBS y secar.
6. A 10 ml de buffer de ácido cítrico, añadir 5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  y 75  $\mu$ l de ABTS. Mezclar bien e inmediatamente añadir 100  $\mu$ l a cada pocillo.
7. Después que el sustrato se ha añadido, se mide y registra periódicamente la densidad óptica.

## 4. PARASITOLOGIA

### 4.1. Introducción

El parasitismo es un fenómeno frecuente en los peces, aunque las enfermedades parasitarias o parasitosis se manifiestan de preferencia cuando las condiciones del medio permiten la proliferación de los parásitos. Si bien en los peces silvestres los parásitos están presentes, las parasitosis se presentan en forma más agudas en peces en confinamiento ya que la densidad poblacional favorece la transmisión y la existencia de reservorios.

Los parásitos de peces pertenecen de preferencia a dos grandes grupos taxonómicos: la Clase Crustacea (todos parásitos externos) y los Vermiformes entre los cuales hay externos que se fijan a la piel o branquias e internos que usan al pez como huésped de una fase de su ciclo vital y que necesitan a menudo de uno o varios huéspedes intermediarios.

Los protozoos parásitos que son responsables de enfermedades infecciosas pueden pertenecer a los grupos de los Flagelados, Ciliados o Esporozoarios y pueden ser externos o internos. Los externos pueden ser cutáneos o branquiales como por ejemplo *Costia*, o bien subcutáneos como *Ichtyophthirius*, *Chilodonella* y *Trichodina*. Los internos pueden hallarse en la cavidad intestinal (*Hexamita*) o pertenecer a la sangre (*Trypanosoma*) u otros tejidos (*Myxobolus*)

Con respecto a las Myxobolosis por *Myxobolus cerebralis*, después de los trabajos de Wolf y Markiu en 1984, ha dejado de tener la importancia que se le atribuía anteriormente, por su naturaleza incontrolable. El cambio de estatus radica en el descubrimiento del ciclo de transmisión en el que interviene un anélido de la familia Turbificidae, presente en las piletas de tierra. Esta modalidad de cultivo en tierra no se practica en las pisciculturas comerciales de nuestro país, por lo que podría suponerse que los cultivos en Chile estarían relativamente protegidos de su aparición.

En cambio, dentro de los protozoos del tipo Myxozoa, *Ceratomyxa shasta*, agente causal de la Ceratomyxosis, no presente en Chile, podría ser una enfermedad que reviste carácter de alto riesgo para los cultivos considerando lo peligroso que resulta el desconocimiento de su ciclo de transmisión, la ausencia de tratamiento efectivo y las altas mortalidades ocurridas en la costa del Pacífico Norte oriental (Estado de Washington, Oregon, Idaho y California)(Kinkelin et al., 1985), zonas de procedencia de ovas importadas por Chile. Por ello, esta es la única enfermedad parasitaria considerada de alto riesgo no presente en Chile.

La importancia económica de las parasitosis se puede atribuir tanto a las mortalidades o bajos rendimientos como a los costos de los tratamientos antiparasitarios. Los parásitos más temibles desde el punto de vista económico son los microparásitos cutáneos branquiales como *Costia*, *Ichthyophthirius*, *Gyrodactylus*, *Argulus* y algunos microsporidios. Algunos de estos últimos, podrían representar un riesgo dada su transmisión vertical, como por ejemplo *Pleistophora* sp. (Kinkelin et al, 1985).

Mención aparte merecen las micosis de los peces las que constituyen un aspecto menos explorado de la Ictiopatología. Kinkelin et al.(1985), distinguen tres tipos de micosis:

- **Micosis superficiales** que evolucionan a partir de puntos de colonización de los tegumentos o de las mucosas cuando se producen heridas causadas por distintos mecanismos como manipulación infecciones bacterianas o virales, y se les conoce como proliferaciones algodonosas, clasificándose globalmente como **Saprolegniosis**.

- **Micosis vasculares branquiales:** branquiomicosis Aunque algunos autores consideran indiferenciables los Branchiomyces de las Saprolegnia, se argumenta que las primeras producirían infecciones de orígenes endógenas, a la que las esporas tendrían un tropismo con el oxígeno y llegarían a las branquias por vía sanguínea.

- **Micosis profundas:** debidas a especies bastante heterogéneas en su estatus taxonómico pero cuyo cultivo es generalmente posible y certero en su identificación. Entre ellas se encuentran *Ichthyophonus* y *Phoma*.

En este manual no se expondrán los procedimientos diagnósticos en detalle de cada una de las enfermedades parasitarias ni de las micosis ya que las patologías de origen parasitario y micótico que afectan a los Salmónidos en Chile no revisten peligrosidad como para ser considerados enfermedades de alto riesgo y son controlables con medidas de manejo preventivo. Sólo se exponen procedimientos generales para detección de parásitos de peces y los procedimientos específicos para algunos patógenos pueden ser consultados en libros y trabajos especializados.

#### 4.2. Toma de muestras

1. En la medida de lo posible, el examen se realizará siempre sobre peces recién sacrificados. Esto es de especial importancia en la detección de muchas especies de protozoos que no podrían verse con facilidad en material conservado o congelado, y es **absolutamente** necesario si se van a realizar preparaciones histológicas.
2. Antes de la fijación, en aquellos peces que superen algunos centímetros de longitud, es conveniente realizar un corte a lo largo de la cavidad del cuerpo con el objeto de facilitar la penetración del fijador.

#### 4.3. Envío de muestras al laboratorio:

1. Las muestras deben provenir de peces recién sacrificados. Si ello no fuese posible, se conservarán en formol al 4% tamponado, o bien congeladas. Este último método destruye pequeños helmintos, especialmente monogenea, pero puede utilizarse

si no se están pesquisando estos parásitos.

#### 4.4. Procedimientos para la detección de agentes parasitarios:

##### 1. Detección de parásitos externos.

Se debe examinar cuidadosamente la superficie corporal y las branquias, ya que algunos ectoparásitos pueden detectarse a simple vista. Aquellos parásitos que no pueden verse a simple vista, podrán ser detectados a través del microscopio estereoscópico con aumento 10x. Ectoparásitos de tamaño aún más pequeños requerirán aumentos de 100x a 500x, para lo cual es recomendable preparar montajes en fresco de los filamentos branquiales y del mucus raspado de la superficie corporal del pez.

##### 2. Detección de parásitos internos

Para el estudio de endoparásitos se debe seguir el mismo procedimiento que para los ectoparásitos pero, después de haber tomado las muestras bacteriales y virales.

Se observará externamente las vísceras a través del microscopio estereoscópico para detectar quistes, vermes o algún aspecto inusual. Se recomienda además examinar los ojos y el cerebro, colocándolos en recipientes separados conteniendo agua o solución salina al 0,85%. Luego, realizar frotis de contenidos y raspados intestinales, vejiga, riñón, hígado y de cualquier anomalía interna que se presente, estudiándolas a 100, 200 y 500x.

## II. ANALISIS ESPECIFICOS DE ENFERMEDADES VIRALES

### 1. NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA

Se presentan las enfermedades virales de Alto Riesgo, presentes y presuntas en el país.

\* **Agente etiológico:** Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)

\* **Signos clínicos con significado diagnóstico**

Enfermedad aguda que causa mortalidad en alevines y peces pequeños, ocasionalmente en peces de 1 año, en truchas y salmones. Generalmente resultan afectados primero los alevines y juveniles más grandes y de aspecto más saludable. Cuando la tasa de mortalidad es alta pueden ocurrir movimientos giratorios, los peces nadan girando alrededor de su eje mayor. Cuando este comportamiento no es obvio, la alarma de los peces por un golpe seco en la pileta u otro sobresalto a menudo producen la respuesta giratoria. Un comportamiento anormal puede alternar con reposo durante el cual los peces yacen sobre el fondo del estanque y respiran débilmente. El movimiento giratorio es un signo terminal y la muerte se produce generalmente en una o dos horas.

Los signos incluyen el oscurecimiento total, exoftalmia, distensión abdominal y, a veces, hemorragias en las áreas ventrales incluyendo a la base de las aletas. Internamente aparecen múltiples petequias en la zona de los ciegos pilóricos y el hígado y bazo se encuentran pálidos. El tracto digestivo generalmente se halla sin comida, de acuerdo con ello, el estómago aparece blanquecino. En el estómago y el intestino anterior hay un mucus claro a lechoso.

\* **Procedimientos diagnósticos**

-DIAGNOSTICO PRESUNTIVO

Presencia de un ECP típico en el cultivo celular. Las células de la monocapa se redondean y se separan unas de otras, algunas se desprenden y flotan en el medio. Las que permanecen adheridas adquieren forma de huso. Además, se deben observar los siguientes aspectos:

+El exámen histológico revela una pronunciada necrosis pancreática con los dos tipos de tejidos afectados, tanto de los acinos como de los islotes. Tejido adiposo adyacente necrótico. Inclusiones citoplasmáticas en las células pancreáticas cerca de los bordes afectados.

+Si se observa la presencia de signos clínicos como los que se describieron anteriormente.

+Si la historia del establecimiento o del medio natural indica probabilidad de IPN.

-DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO

De los 3 serotipos conocidos del IPNV, el aislado en Chile por McAllister y Reyes en 1984 es el VR-299. Por ésto, el método confirmatorio de seroneutralización es una via factible. Las observaciones histopatológicas pueden ayudar en la confirmación del diagnóstico.

Otra técnica confirmatoria es la inmunofluorescencia en monocapas de células.

## 2. LEUCEMIA PLASMACITOIDEA

**Agente etiológico: Partículas como Retrovirus.**

Esta enfermedad se incluye en las de Alto Riesgo, debido a que en la información proveniente de Centros y Laboratorios encuestados, fue mencionada. La información

existente es escasa y el presunto virus no ha sido aislado. Esta condición fue descrita por Kent et. al, 1990, en salmón Chinook en Canadá. Kent y Dawe, 1993, sugieren que el microsporidio *Enterocytozoon salmonis*, estaría involucrándose como cofactor de la enfermedad.

\* **Signos clínicos de significado diagnóstico:**

Alta mortalidad en salmones en el mar.

Palidez branquial debida a anemia.

Exoftalmia bilateral. Bazo y riñón dilatados. Ascitis.

Histológicamente se observa una proliferación plasmacitoídea en riñón, Bazo, intestino, pancreas, hígado, corazón y órbita ocular.

**-DIAGNOSTICO PRESUNTIVO.**

Basado en signos y en la evidencia histopatológica.

El uso de microscopio electrónico revelaría partículas como retrovirus de 105-125 nm de diámetro. Los intentos por ser aislado en las líneas celulares EPC, RTG-2 y CHSE-214, no han sido exitosos.

**-DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO.**

Newbound et. al, desarrollaron en 1993 anticuerpos monoclonales a partir de tejido de peces infectado con Leucemia Plasmacitoidea. Por lo tanto la identificación confirmatoria no se ha logrado hasta que el virus no sea aislado y la diagnosis se basa sólo en las pruebas presuntas.

**3. NECROSIS HEMATOPOYETICA INFECCIOSA (IHN)**

**Agente etiológico: Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV).**

Se ha incluido com enfermedad de alto riesgo presunta, porque aunque no hay información sobre brotes, aparece como diagnóstico presunto informada por algunos Laboratorios de Asistencia Ictiopatólogica (Encuestas a Laboratorios). IHNV, es una

importante enfermedad viral de truchas y salmones. Un brote de IHN puede causar pérdidas explosivas de hasta el 100% en peces pequeños (alevines). La resistencia a la enfermedad aumenta con la edad, en peces más grandes la mortalidad es reducida (25% o menos) y a menudo llega a ser crónica. Una secuela con repercusiones económicas es la presencia de escoliosis en un 2-4% de los sobrevivientes, los cuales además de permanecen como reservorios de virus que ha menudo vierten durante el desove. La transmisión natural ocurre horizontalmente a través del agua de portadores desovantes a peces susceptibles o, esparcida en el agua de alevines infectados o no infectados. También puede transmitirse verticalmente con los huevos (posiblemente en la superficie del huevo).

\* **Signos clínicos con significado diagnóstico.**

Letargia o nado en giros en algunos peces, hinchazón abdominal, exoftalmia, anemia, base de aletas y musculatura hemorrágicas, coloración oscura. Internamente se presenta palidez en hígado, bazo y riñón, estómago e intestino llenos de fluido lechoso o acuoso. Hemorragias petequiales en mesenterio o tejidos viscerales y musculatura.

**-DIAGNOSTICO PRESUNTIVO**

Se considera las evidencias epizootológicas (signos). Aparición de EPC típico en células susceptibles (CHSE-214, RTG-2 y EPC). Los tejidos empleados son riñón y bazo o fluidos sexuales. En caso de alevines pequeños se usan enteros (Fryer, 1989).

**-DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO**

Seroneutralización de virus aislado.

Winton 1991, hace una revisión de varios mejoramientos recientes de los métodos para detectar IHNV incluyendo la aplicación de ELISA, el desarrollo de anticuerpos monoclonales y pruebas de DNA y el uso de la Reacción de la Cadena de Polimerosa (PCR), que prometen ser rápidos, sensibles, específicos y efectivos en costos.

### III. ANALISIS ESPECIFICOS DE ENFERMEDADES BACTERIANAS

Se han considerado sólo aquellas enfermedades presentes en nuestro país y que han provocado las mayores pérdidas económicas.

#### 1. ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑON

\* **Agente Etiológico: Renibacterium salmoninarum**

\* **Signos clínicos con significado diagnóstico**

Las formas agudas y subagudas de la enfermedad suceden sólo esporádicamente. Es más típico encontrar la enfermedad en forma crónica. Rara vez ocurre en peces de menos de 6 meses de edad. La enfermedad crónica se caracteriza internamente por un riñón inflamado, edematoso, que puede aparecer gris y corrugado, generalmente exhibe lesiones blanquecinas que varían en tamaño y número. Estas lesiones a veces se encuentran también en otros órganos, principalmente en hígado y bazo. A menudo hay un fluido turbio en las cavidades abdominal y pericárdica, especialmente en los peces más viejos. Externamente los signos clínicos son de menor valor diagnóstico, los peces pueden parecer normales o mostrar uno o más de los siguientes signos: exoftalmia, petequiación de la piel, vesículas en la piel.

\* **Procedimientos diagnósticos.**

##### -DIAGNOSTICO PRESUNTIVO

Los frotis de tejido infectado deben contener numerosos diplobacilos pequeños, Gram positivos, no ácido resistentes que ocurren intra y extracelularmente; el organismo no crece en TSA a 20°C aún cuando se usan períodos de incubación extensos (por ejemplo 2 semanas).

## -DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO

Se realiza a través de la prueba inmunológica ELISA. Esta técnica ha sido ampliamente desarrollada para esta enfermedad, presenta mayor sensibilidad, objetividad y capacidad de análisis. Como alternativa para pequeños volúmenes de muestra puede usarse IFAT. Ambas técnicas están implementadas en la mayoría de los laboratorios ictiopatólogicos del país, según lo indican las encuestas realizadas en este estudio, y los reactivos de análisis están disponibles en forma comercial.

## 2. ENFERMEDAD ENTERICA DE LA BOCA ROJA

\* **Agente etiológico : Yersinia ruckeri**

\* **Signos clínicos con significado diagnóstico**

La enfermedad puede ocurrir como una condición hiperaguda, aguda o subaguda y hasta crónica. Los signos clínicos de las formas agudas de la enfermedad son muy similares a aquellos vistos en otras septicemias bacterianas; no obstante, puede ser de algún valor diagnóstico la presencia frecuente de enrojecimiento en la boca y hemorragias en el intestino posterior. En las infecciones más crónicas, los signos clínicos, cuando son considerados en conjunto con el origen y la historia de los peces, pueden brindar claves valiosas como para identificar la enfermedad. En infecciones crónicas los peces son oscuros, letárgicos y comúnmente muestran exoftalmia bilateral, la cual puede progresar hasta ruptura del ojo. Puede haber petequiación cutánea, pero la piel se encuentra intacta. Hemorragias petequiales ocurren difusamente sobre (y dentro) de las vísceras y musculatura.

\* Procedimientos diagnósticos

El diagnóstico se basa en el aislamiento y la identificación del agente causal. El aislamiento primario debe hacerse del riñón sobre agar-soya-tripticosa incubado a 20 - 25°C durante 24 a 48 horas. **Yersinia ruckeri** crece bastante rápido, y es posible tener los cultivos antes de 24 hrs.

Los cultivos puros pueden ser identificados fácilmente por medio de las tablas diagnósticas convencionales, y luego confirmado por serología. Mediante las claves del API-20, **Y. ruckeri** puede ser confundida con **Hafnia alvei**, por lo que en este caso debe también ser confirmado posteriormente por serología. Se puede hacer uso del serodiagnóstico para detectar y diagnosticar infecciones asintomáticas, en particular el IFAT y aglutinación bacteriana.

-DIAGNOSTICO PRESUNTIVO.

Para la identificación presuntiva el organismo debe ser un bacilo Gram-negativo, citocromo oxidasa negativo que no produce indol en caldo de triptona. En Agar-Hierro- triple azúcar (TSI), produce reacción alcalina en la superficie inclinada y ácido en sólomente en el fondo. Las características adicionales que podrían ser también verificadas para el organismo, en las pruebas presuntivas, son su capacidad para fermentar glucosa (en el medio de glucosa se produce ácido pero no gas) y su motilidad.

-DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO

Las pruebas confirmatorias se realizan mejor serológicamente, usando la prueba de aglutinación en portaobjetos. En algunos laboratorios se está implementando la técnica Elisa sandwich (Francke et al. 1994) para esta patología. Se conocen dos serotipos del agente. En Chile ha sido diagnosticado el serotipo I.

### 3. SEPTICEMIA RICKETTSIAL DE SALMONIDOS

\* Agente etiológico : Piscirickettsia salmonis

\* Signos clínicos con significado diagnóstico

Los peces pueden mostrar los signos clásicos de enfermedad como coloración oscura, letargia y nado en superficie. Algunos peces mueren con muy pocos signos de anormalidad. Las lesiones externas incluyen branquias pálidas y heridas en la piel. Internamente el pez tiene evidencia de ascitis, peritonitis y palidez. El tracto gastrointestinal, a menudo se presenta lleno de fluido y sin alimento y junto con la vejiga gaseosa y las grasas viscerales pueden tener hemorragias petequiales. El bazo, hígado y riñón, están a menudo dilatados, estos dos últimos pueden presentar decoloración. En algunos casos el hígado presenta nódulos blanquecinos.

\* DIAGNOSIS PRESUNTA

Para este diagnóstico, Lannan y Fryer (1991) establecieron los procedimientos de cultivos celulares para la aislación y detección presunta del patógeno.

-Preparación de la muestra

1. Tomar una muestra de riñón asépticamente y transferir a un recipiente estéril. Los tejidos deben guardarse a 4°C o en hielo hasta ser procesados, pero no deben ser congelados. No se deben usar antibióticos en ningún paso del procedimiento.
2. El tejido renal se debe homogenizar hasta 1:20 en una solución salina balanceada libre de antibióticos (PBS) y enseguida, sin centrifugar, diluir 1:5 y 1:50 en PBS. Las soluciones finales para uso son  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ .

#### -Inoculación en células

1. Se usa la línea celular CHSE-214 (ATCC CRL 1681). Los cultivos se deben mantener en un medio libre de antibióticos.
2. Ambas diluciones ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) del homogenizado de tejido renal, deben inocularse en el cultivo celular. El homogenizado diluído debe ser inoculado directamente (0,1 ml/cultivo) en el medio libre de antibióticos que cubre las células.
3. Los cultivos celulares deben ser incubados a 15-18°C por 28 días y observarse la aparición del efecto citopático (ECP). El ECP rickettsial consiste en aglomeraciones en forma de placas de células redondeadas. Con el tiempo, el ECP avanza hasta destruir completamente la capa de células.

#### \* DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO

Lannan et. al. (1991), desarrollan el método del anticuerpo fluorescente (IFAT) para la detección de la *Rickettsia*, que causó epizootias en salmones cultivados en Chile.<sup>1</sup>

En esta prueba, se puede usar los flúidos provenientes de los cultivos celulares que muestran efecto citopático, los que pueden ser colocados directamente sobre un portaobjetos, según las técnicas IFAT y observar directamente al microscopio, o bien, el flúido inocularlo en cubreobjetos que contengan una monocapa de células CHSE-214. Esta debe ser incubada por 5-6 días antes de proceder con la técnica IFAT.

---

<sup>1</sup> Este método también puede ser utilizado para un diagnóstico rápido sobre los frotis preparados directamente del tejido sospechoso. Esta es una alternativa actualmente muy utilizada en Chile.

#### 4. ENFERMEDAD BACTERIANA DEL AGUA FRIA

\* **Agente etiológico: Flexibacter psychrophilus.**

Esta enfermedad afecta probablemente a todas las especies de salmónidos (Amos, 1985). Aparece cuando las temperaturas del agua están entre 4-10° C y la severidad y signos específicos parecen depender del estado de desarrollo del alevín (Wood, 1974). Cuando los alevines desarrollan la enfermedad pueden ocurrir mortalidades de 30-50% y los signos se limitan a erosión en la piel que cubre la yema; la coagulación de la yema a menudo precede un brote de esta enfermedad (Inglis, et. al 1983).

\* **Signos clínicos con significado diagnóstico**

En nuestro país, la enfermedad se presentó inicialmente en trucha arcoiris en 1993, con severas mortalidades que llegaron a alcanzar el 50-60% (BUSTOS, 1994). Los signos informados en su trabajo, indican que los peces afectados presentan letargia, natación superficial, pérdida de apetito y oscurecimiento de la piel. Hay ulceraciones en el vientre, llegando a perforar la pared y a producir evisceración parcial. Hay palidez branquial mostrando éstas hemorragias lineales y puntiformes múltiples.

Se observan hemorragias en la base de las aletas y a nivel ocular, exoftalmia bilateral y leve protrusión del poro urogenital. Es común la distensión abdominal, particularmente en los casos más crónicos. Los signos internos más relevantes son: severa inflamación, petequias en bazo, y frecuentemente del riñón e hígado. Muchas veces el riñón muestra severa palidez y aparente atrofia en la mitad anterior (zona hematopoyética) y grisáceo en el polo posterior (area excretora). Estos tres organos presentan una consistencia blanda. No hay alimento en el tracto digestivo, muchos peces presentan dilatación gástrica leve, acumulación de líquido en dicha cavidad, gastritis catarral, enteritis hemorrágica o muco-hemorrágica y petequias en los ciegos pilóricos. La grasa visceral, muestra clara hemorragia asociada o congestión.

\* Procedimientos diagnósticos

-DIAGNOSTICO PRESUNTIVO.

Se deben considerar las siguientes características para la identificación de *F.*

*psychrophilus*:

- Colonias amarillas convexas en Agar Cytophaga
- Bacilos Gram negativos, delgados y largos (0,5-0,75 x 2-7  $\mu$ m).
- Temperatura óptima de crecimiento 15-18° C. No crece a 30° C.
- Activamente proteolítico para la gelatina y caseína.
- No produce ácido desde carbohidratos simples o complejos.
- Las colonias cambian a rojo en presencia de KOH 20%.
- Rápidamente Catalasa positivo.
- Crecimiento escaso o nulo en TSA o BHI.
- Se observa motilidad deslizante, a veces con dificultad.

-DIAGNOSTICO CONFIRMATORIO

Test de aglutinación con antisuero para *F. psychrophilus*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMOS, K.H., 1985. Procedures for Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. 3d. ed. Fish Health Section, American Fisheries Society. Corvallis, Oregon.
- BROCK, T.D.; D.W. SMITH y M.T. MADIGAN. 1987. Microbiología. 4º Edición. Prentice - Hall Hispanoamericana S.A. Mexico.
- BUSTOS, P. 1994. Primer aislamiento de *Flexibacter psychrophilus*, como causal de "Rainbow trout fry syndrome" (RTFS), originando mortalidades en trucha arcoiris en Chile. Seminario Internacional "Patología y Nutrición en el desarrollo de la Acuicultura: Factores de Exito". FUNDACH. 3 al 7 Octubre P. Montt, CHILE.
- FRANCKE, S., M. MORALES, E. MADRID, A. KLEMPAU. 1994. Desarrollo de Técnica ELISA en doble sandwich contra *Y. ruckeri*. XIV Jornadas de Ciencias del Mar y la. Jornadas de Salmonicultura. P. Montt, Chile. 177 pp.
- FRYER, J.L. 1989. Ictiopatología. Enfermedades de Etiología bacteriana y Viral en salmonídeos. Curso de Post-Título. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Escuela de Post-Grado. Santiago, Chile.
- HETRICK, F.M. and R.P.HENDRICK. 1992. New Viruses Described in Finfish from 1988-1992. Annual Rev. of Fish Disease pp 187-207.
- INGLIS, V., R.J. RONALD, N.R. BROMAGE. 1993. Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Scientific Publications. Osney Mead, Oxford. Great Britain.
- KINKELIN, P.; CH. MICHEL y P. GHITTINO. 1985. Tratado de las Enfermedades de los Peces. Editorial Acribia, S:A., Zaragoza (España): 353 pp.
- LANNAN, C. N and J.L. FRYER. 1991. Recommended methods for inspection of fish for the Salmonid rickettsia. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11(4): 129-131.
- LANNAN, C. N., S.A. EWING, and J.L. FRYER. 1991. A fluorescent Antibody test for Detection of the Rickettsia causing Disease in Chilean Salmonids. J. Aquat. Animal Health 3: 229-234.

- McCALLISTER, P.E., X.REYES, 1984. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: isolation from Rainbow Trout , *Salmo gairdneri* Richardson, import into Chile. Journal of Fish Diseases, 7:319-322.
- MELLENDEZ, L.V.; G.G. SCHURIG; A.A.SCHUDEL; J.E.DEVERY-POCIUS y L.M. DELLERS. 1987. Manual de Diagnóstico rápido de Enfermedades Virales de los animales, utilizando Métodos Inmunoenzimáticos. I.I.C.A. Serie Salud Animal. Publicación Científica N° 15: 33 pp.
- STOLEN, J.S.; T.C. FLETCHER; D.P. ANDERSON; B.S. ROBERSON; W.B. van MUISWINKEL (Eds). 1990. Techniques in Fish Immunology. 1<sup>st</sup> Edition. S.O.S. Publications U.S.A.
- WINTON, J.R. 1991. Recent advances in Detection and Control of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Aquaculture. Annual Rev. of Fish Diseases: 83-93.
- WOOD, J.W. 1974. Diseases of Pacific Salmon. Their Prevention and Treatment. State of Washington Department of Fisheries Hatchery Division. 82 pp.
- WOLF, K. 1988. Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY, 476 pp.
- WOLF, K. and M.E. MARKIW. 1984. Biology Contravenes Taxonomy in the Myxozoa: New Discoveries Show Alternation of Invertebrate and Vertebrate Hosts. Science, Vol. 225. Research Article: pp. 1449-1452.

## APENDICE 1

### MEDIOS DE CULTIVO, TINCIONES Y SOLUCIONES DE USO FRECUENTE.

#### 1. Tinciones

##### 1.1. Tinción de Gram

###### 1.1.1. Procedimiento:

Preparar un frotis y fijarlo al calor.

Colocar solución de cristal violeta durante 1 minuto.

Lavar con agua corriente durante algunos segundos.

Cubrir con solución yodada durante treinta segundos.

Lavar con agua corriente unos 15 segundos.

Decolorar por 30 segundos con alcohol decolorante.

Lavar con agua corriente.

Teñir con safranina durante 30 segundos.

Lavar con agua corriente.

Sacar y examinar al microscopio con objetivo de inmersión.

Los micro-organismos Gram positivos se ven de color azul, los Gram negativos, de color rojo.

###### 1.1.2. Reactivos:

###### \* Solución Cristal Violeta:

a)	Cristal violeta	2 g
	Alcohol etílico	20 ml
b)	Oxalato de amonio	0,8 g
	Agua destilada	80 ml

Preparar las soluciones por separado y luego mezclarlas.

###### \* Solución Yodada:

Yodo	1 g
Yoduro potásico	2 g
Agua destilada	300 ml

Disolver el Yodo con el Yoduro potásico en 5 ml de agua, agregar el resto del agua destilada.

**\* Alcohol decolorante:**

Alcohol etílico	95 ml
Acetona	5 ml

**\* Safranina**

Safranina	0,25 g
Alcohol etílico	10,0 ml
Agua destilada	100 ml

**1.2. Tinción de Ziehl Nielsen (Tinción Acido Resistente)**

1.2.1. Procedimiento:

Se fija el frotis al calor.

Se tiñe con colorante de Ziehl-Nielsen durante 5 minutos, y se calienta la preparación a la llama del mechero hasta la emisión de vapores del colorante.

Se lava con agua corriente.

Tinción de contraste con solución acuosa de azul de metileno al 5%.

Lavar con agua corriente.

Secar y examinar con objetivo de inmersión.

Los micro-organismos alcohol-ácido resistentes se ven de color rojo. Otras bacterias y restos celulares se ven azules.

### 1.2.2. Reactivos:

* Solución A:	Fucsina básica	0,3 g
	Alcohol etílico 95%	10 ml
* Solución B:	Fenol	5 g
	Agua destilada	95 ml

Mezclar ambas soluciones. Para tinciones ordinarias se usa sin diluir. Para contra-tinción en el método Gram, diluir 1:10 con agua destilada.

## 2. Medios de cultivo

### 2.1. TSA (Tryptic Soy Agar)

Medio disponible en el mercado. DIFCO, MERCK, BBL.  
Para patógenos marinos adicionar 1-2 g de NaCl.

### 2.2. Agar Cytophaga (CA) pH final 7,2

Triptona	0,5	g
Extracto levadura	0,5	g
Acetato de Sodio	0,2	g
Extracto de carne	0,2	g
Agar	11,0	g
Agua destilada	1000	ml

### 2.3. Agar Shieh pH final 7,2

Peptona	0,5	g
Sodio acetato	0,001	g
Extracto levadura	0,05	g
BaCl H <sub>2</sub> O	0,001	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,01	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,005	g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,03	g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,00067	g
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,0001	g
NaHCO <sub>3</sub>	0,005	g
Agar	1,1	g
Agua destilada	100	ml



### 2.9. KDM-2, para crecimiento de *Renibacterium salmoninarum*

Peptona	1	g
Extracto de levadura	0,05	g
Cysteina HCl	0,1	g
Agar	1,5	g
Suero	20	ml

Mezclar y disolver calentando. Ajustar a pH 6,5. Autoclavar a 115°C por 20'. Enfriar a 45°C y adicionar 100 ml de suero bovino fetal.

### 2.10. Medio SW, para aislar *Yersinia ruckeri*.

Triptona	2	g
Extracto levadura	2	g
Tween 80	10	ml
NaCl	5	g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,1	g
Azul bromotinol	0,006	g
Agar	15	g
Agua	980	ml

Después de esterilizar y dejar enfriar a 50°C, se añade 10 ml de una solución de sacarosa (0,5 g/ml) esterilizada por filtración. Mezclar y verter en placas.

### 2.12. Solución de montaje para inmunofluorescencia.

Glicerol	90%
Buffer	10%

Buffer:

0,5 M Buffer carbonato / bicarbonato, pH 9,7
0,4 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
0,4 M NaHCO <sub>3</sub>

### 3. SOLUCIONES PARA VIROLOGIA

#### 3.1. Medio de cultivo enriquecido para células de peces.

Producto disponible en el mercado bajo el nombre Minimum Essential Medium (MEM 1X). El medio se rehidrata de acuerdo a las instrucciones del envase, se filtra y esteriliza.

**MEM-10** Para crecimiento y mantención de líneas celulares.

MEM (1X)	395 ml
Suero Bovino Fetal	50 ml
Penicilina/Estreptomina	5 ml
L-glutamina	5 ml

#### 3.2. Tripsinización de células

PBS	900 ml
Tripsina-EDTA (10X)	100 ml

#### 3.3. Tampón Tris (1 Molar)

Tris-Hydrochloride (acid)	106,4 g
Tris-Buffer	39,4 g
Agua bidestilada, aforar a	1000 ml

Como alternativa se puede utilizar solución estéril de Bicarbonato de Sodio (Disponible en el mercado).

## 4. SOLUCIONES PARA ELISA

### 4.1 Phosphate Buffered Saline (PBS), 0,01 M pH 7,2

7,5	g	NaCl
0,245	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (monobásico)
0,809	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (dibásico)
1.000	ml	H <sub>2</sub> O csp

### 4.2 Tween 20 + Tris Buffered Saline (TTBS) pH 8,0

60,7	g	Tris Base
4,09	g	EDTA
87,0	g	NaCl
10	l	tH <sub>2</sub> O csp

Agregar 10 ml de Tween 20

Ajustar el pH a 8,0, con aproximadamente 10 ml de HCl

### 4.3 2,2-Azinobis (3-EthylBenzThiazoline Sulfonic Acid) (ABTS)

0,1 g ABTS (sal diamónica)  
10,0 ml de agua destilada

### 4.4 Buffer de ácido cítrico pH 4,0

0,2 g Acido cítrico (monohidrato. PM = 210)  
100 ml agua destilada  
llevar a pH 4,0

### 4.5 TNP-BSA

Seroalbúmina de bovino trinitrofenilada. Se prepara de acuerdo a Garvey et al, 1977.

### 4.6 TNP-KLH

Trinitrophenylated keyhole limpet hemocyanin. Se prepara de acuerdo a Rittenberg y Amkraut, 1966.

# INDICE DE MATERIAS

Pág.

I. INTRODUCCION . . . . .	1
1. TOMA DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES DE NECROPSIA . . . . .	2
1.1 Tamaño de la Muestra . . . . .	2
1.2 Procedimientos de Necropsia . . . . .	3
2. VIROLOGIA Y CULTIVOS CELULARES . . . . .	4
2.1 Introducción . . . . .	4
2.2 Toma de Muestras . . . . .	5
2.3 Envío de Muestras al Laboratorio . . . . .	6
2.4 Tratamiento de la Muestra . . . . .	6
2.5 Diagnóstico de las Enfermedades Virales . . . . .	7
2.6 Cultivo de Células . . . . .	6
2.7 Aislamiento de Virus . . . . .	8
2.8 Control de Calidad de los Cultivos Celulares . . . . .	9
2.9 Control de los Análisis Virales . . . . .	10
2.10 Identificación de Virus por Seroneutralización . . . . .	10
2.11 Otros Métodos para Identificación de Virus . . . . .	12
3. BACTERIOLOGIA: PROCEDIMIENTOS DE DETECCION E IDENTIFICACION . . . . .	13
3.1 Introducción . . . . .	13
3.2 Toma de Muestras . . . . .	14
3.3 Envío de Muestras al Laboratorio . . . . .	15
3.4 Procedimientos de Detección e Identificación . . . . .	16
4. PARASITOLOGIA . . . . .	30
4.1 Introducción . . . . .	30
4.2 Toma de Muestras . . . . .	32
4.3 Envío de Muestras al Laboratorio . . . . .	32
4.4 Procedimientos para la Detección de Agentes Parasitario . . . . .	33

II. ANALISIS ESPECIFICOS DE ENFERMEDADES VIRALES . . . . .	34
1. Necrosis Pancreática Infecciosa . . . . .	34
2. Leucemia Plasmacitoidea . . . . .	35
3. Necrosis Hematopoyetica Infecciosa . . . . .	36
III. ANALISIS ESPECIFICOS DE ENFERMEDADES BACTERIANAS . . . . .	38
1. Enfermedad Bacteriana del Riñón . . . . .	38
2. Enfermedad Enterica de la Boca Roja . . . . .	39
3. Septicemia Rickettsial de Salmónidos . . . . .	41
4. Enfermedad Bacteriana del Agua Fría . . . . .	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS . . . . .	45
APENDICE 1 . . . . .	47
MEDIOS DE CULTIVO, TINCIONES Y SOLUCIONES DE USO FRECUENTE . . . . .	47
1. Tinciones . . . . .	47
2. Medios de Cultivo . . . . .	49
3. Soluciones para Virología . . . . .	52
4. Soluciones para Elisa . . . . .	52



FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA

**INFORMES TECNICOS F I P**

FIP - IT / 93 - 29

ANEXO II : MANUAL DE PREVENCIÓN Y TRATAMIENT  
INFORME : TO DE ENFERMEDADES DE SALMONIDOS  
FINAL : DE CULTIVO

UNIDAD : ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR  
EJECUTORA : UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO  
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR  
BASE PUERTO MONTT

MINISTERIO DE PLANIFICACION Y DESARROLLO  
CORPORACION DE FOMENTO DE LA PRODUCCION  
INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO  
DIRECCION ZONAL X Y XI REGIONES

**MANUAL DE PREVENCION  
Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES  
DE SALMONIDOS DE CULTIVO**

por

**Mariel Campalans B.**

**Patricia Rojas Z.**

**Raúl Castro D.**

1995

**ESTE MANUAL FORMA PARTE DEL PROGRAMA DE  
VIGILANCIA DE PATOLOGÍAS DE SALMONÍDEOS CULTIVADOS  
EN LA ZONA SUR AUSTRAL.**

**PROYECTO No.23; CODIGO FIP: 025-94-01**

**REQUIRENTE:** Fondo de Investigación Pesquera (FIP)

Convenio aprobado por Decreto Supremo N° 426 del 19 de agosto de 1994, del Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción.

**CONTRAPARTE:** Universidad Católica de Valparaíso  
Facultad de Recursos Naturales

**UNIDAD EJECUTORA:** Escuela de Ciencias del Mar  
Facultad de Recursos Naturales  
UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

**Instituto de Fomento Pesquero**  
Corporación de Fomento de la Producción  
MINISTERIO DE PLANIFICACION Y DESARROLLO

**INVESTIGADOR RESPONSABLE:**

**Mariel Campalans Barnier.**  
Escuela de Ciencias del Mar  
San Cristóbal 563, PUERTO MONTT.

# MANUAL DE PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE SALMONIDOS DE CULTIVO

## INTRODUCCION

El estado de enfermedad de los peces se traduce en la aparición de anomalías en el comportamiento y/o lesiones corporales, que conlleva un descenso en los rendimientos y a menudo la muerte de los individuos afectados.

Es claro que el conocimiento de una enfermedad de peces tiene que derivarse no sólo de la apreciación del microorganismo invasor sino también de su relación con el ambiente y su huésped. Snieszko (1972), fue uno de los primeros en insistir en esto, al señalar que las enfermedades infectocontagiosas en peces pueden ocurrir sólo cuando un huésped susceptible y un patógeno virulento se reúnen bajo condiciones ambientales adecuadas para la inducción de la enfermedad.

Los peces bajo condiciones de cultivo son altamente susceptibles a las enfermedades, dependiendo básicamente del manejo a que son sometidos, en especial a la densidad de carga en espacios reducidos, lo que dificulta el control y terapia dada la rapidez con que se propagan los agentes. De alguna manera los riesgos patológicos de origen natural o inducidos son previsibles y exigen medios permanentes de intervención preventiva.

Como en todas las enfermedades animales que se quiere combatir, en el caso de ocurrir patologías en peces se trata de:

1. Identificar las causas.
2. Favorecer la fisiología normal del pez.
3. Interrumpir la transmisión de los bioagresores.
4. Detener al agente patógeno que haya ingresado, usando terapias o potenciando las reacciones de defensa del huésped.

El presente manual reúne las medidas de prevención en uso en instalaciones de cultivo de salmónidos, además de la normativa vigente que regula la importación de ovas e impide la importación de peces vivos.

Sobre el aspecto terapéutico, se exponen los métodos de tratamiento y los productos utilizados.

# 1. PREVENCIÓN

## \* MÉTODOS DE PREVENCIÓN

El manejo preventivo de las enfermedades infectocontagiosas puede ser visto desde los siguientes aspectos:

1. Prevención del contacto entre patógeno y huésped.
2. Incremento de la resistencia natural o genética (mejoramiento genético).
3. Inmunización (vacunas).
4. Mejoramiento de la respuesta inmune (uso de inmunoestimulantes).
5. Mejoramiento de la dieta.

### **Prevención del contacto entre patógeno y huésped**

Este tipo de prevención está sustentado por dos modalidades de intervención:

1. Intervención puntual sobre los peces disponibles.
2. Intervención coordinada a través de programas de prevención nacionales o internacionales.

#### 1. Intervención puntual

Recientemente ha habido mayor comprensión de la necesidad de estudiar las enfermedades en contexto de su ambiente y de la fisiología de su huésped, y esto ha llevado a la conclusión de que las enfermedades de los peces están casi invariablemente relacionadas con el estrés. La definición de estrés es muy dependiente del usuario, en relación con las enfermedades de los peces; sin embargo, la definición de Brett en 1958 citado por Inglis et. al, 1993, es probablemente la más útil: "Estrés es el estado producido por un factor ambiental u otro, el cual excede las respuestas adaptativas del individuo mas allá del rango normal, de tal modo que sus oportunidades de sobrevivencia están significativamente reducidas". Cuando un pez o una

población de peces es afectado por cualquier factor estresante, la ubicuidad de los agentes potencialmente patógenos en el ambiente y aún dentro de los mismos peces portadores es tal, que el pez es fácilmente expuesto y probablemente sucumbe a tal infección. Los cambios exactos que ocurren en el pez y que gatillan la invasión o multiplicación del agente no son conocidos, pero probablemente se relacionan con la supresión de las defensas no específicas tales como el sistema retículoendotelial y alteraciones en la integridad de superficies mucoides.

Si la capacidad del pez para resistir las infecciones es reducida, los microorganismos, que ya están dentro de los tejidos como es el caso de un pez portador, en el intestino o en el ambiente externo, son capaces de invadir e inducir enfermedades clínicas. La capacidad para tal invasión es un componente inherente a cada patógeno. Es así como se pueden distinguir patógenos primarios, para los que basta sólo un pequeño nivel de estrés para provocar la enfermedad; patógenos secundarios en que el pez tiene que estar muy estresado o bien existir la presencia de un patógeno primario para posibilitar su invasión; un tercer grupo es el que reúne principalmente bacterias que invaden los tejidos de los peces cuando están cercanos a la muerte o **post mortem**, aunque quizás este grupo no puede ser considerado como patógeno propiamente tal (Inglis op.cit).

Las altas densidades unidas a malas prácticas de manejo, en las cuales la aireación y el flujo de agua es insuficiente, facilita el ingreso de enfermedades. Puede bastar solamente un individuo que actúe como reservorio para contaminar el resto del stock.

Es así como podemos señalar que, para el caso de la intervención puntual, se debe poner énfasis en las siguientes situaciones que generalmente se encuentran controladas para salmónidos en cultivo:

- 1) Mantener densidades de carga adecuadas para cada especie en cultivo.
- 2) Extremar las precauciones durante las actividades de traslado, cambio de mallas, muestreos, desdobles, extracción de mortalidad. Esto implica, entre otras cosas, realizar las actividades más riesgosas cuando los peces estén en ayuno.
- 3) Mantener separados los grupos de edades diferentes.
- 4) Evitar la presencia de peces muertos por períodos prolongados (malas condiciones sanitarias). Eliminarlos, enterrándolos en pozos acondicionados cubriendo con cal o incinerando los peces enfermos y deformes. Por ningún motivo se deben desechar al medio (acuático o terrestre).
- 5) Mantener una rutina de muestreos para análisis de salud aún en poblaciones aparentemente sanas.
- 6) Mantener separados los peces recapturados de los del cultivo.
- 7) Desinfectar adecuadamente los materiales que ingresan a la piscicultura. En especial redes y botas.
- 8) Proveer una alimentación balanceada en calidad y cantidad, de acuerdo a los requerimientos de cada especie de cultivo.
- 9) Adquirir peces y ovas desde lugares que mantengan una rutina de inspección sanitaria al día.
- 10) Evitar el movimiento de stocks infectados.
- 11) Evitar la acumulación de materia orgánica, esto es materia fecal y alimento no consumido, dentro de las jaulas o piletas.
- 12) Evitar la acumulación de algas y lama en los estanques.
- 13) Desinfectar el agua sangre proveniente de la operación de cosecha, cualesquiera que sea su destino final. De preferencia usar cloro o productos yodados en concentraciones adecuadas para asegurar la eliminación de patógenos microbianos.

## **2. Intervención coordinada**

Este aspecto está relacionado con la intervención a través de programas de prevención nacional y/o internacional. Con este método, se trata de interrumpir la transmisión de agentes patógenos en zonas más o menos amplias. Esto puede llevarse a cabo destruyendo las fuentes de infección (peces o material contaminado) y sustituyendo los stocks por peces libres de gérmenes específicos.

Las políticas de control son aplicables a aquellos patógenos que no responden rápidamente a la terapia y/o a aquellos que, geográficamente localizados, inducen enfermedades de importancia socioeconómicas.

Este punto se referirá sólo al programa vigente del gobierno chileno para prevenir la entrada de patógenos peligrosos a través de la importación de ovas. Al respecto, se puede mencionar que la normativa vigente está señalada en el Decreto Supremo N° 162 de 1985 del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción y sus Resoluciones asociadas. Un pequeño resumen de su contenido se explica a continuación:

### **DECRETO SUPREMO N° 162, MINISTERIO DE ECONOMIA, FOMENTO Y RECONSTRUCCION, 18 de Julio de 1985.**

**Aprueba reglamento sobre control de enfermedades de peces de la familia salmonidae y otras especies hidrobiológicas y deroga Decreto N° 291 de 1983.**

Del presente decreto interesa destacar lo siguiente:

Se clasifican las Enfermedades en Clase I, II y III, dependiendo de su peligrosidad y posibilidad de tratamiento. Se establece la exigencia de certificado zoosanitario otorgado o visado por el Servicio Nacional de Pesca, que acredita la presencia o ausencia de agentes causales de enfermedades que afectan a las especies hidrobiológicas. Se autoriza la importación de especies salmonideas sólo en estado de ovas o gametos exentos de las enfermedades de la Clase I, excepto para BKD en cuyo caso se exige certificado de tratamiento profiláctico de reproductores y ovas.

Se establece las medidas de control para la aparición de enfermedades de la Clase I.

**RESOLUCIÓN EXENTA N° 2459, SERVICIO NACIONAL DE PESCA,  
23 DE NOVIEMBRE DE 1993.**

Establece condiciones para importación de ovas de especies salmonidas, complementarias a las establecidas en el D.S. N°162 de 1985 del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción exenta N°0548 de 1988, del Servicio Nacional de Pesca.

Se destacan las exigencias de desinfección en cuanto a productos, tiempos y dosis antes de ser enviadas y a la llegada al país, previo a ser depositadas en agua corriente.

**RESOLUCIÓN N° 2158, SERVICIO NACIONAL DE PESCA,  
21 DE OCTUBRE DE 1994.**

Establece condiciones de la importación de ovas de salmonidos, complementarias a las señaladas en la resolución exenta n°2459 de 1993 del Servicio Nacional de Pesca.

Señala el método de diagnóstico de la Enfermedad Bacteriana del Riñón que debe ser aplicado a los reproductores que dan origen a las ovas que serán internadas en el país.

**\* INCREMENTO DE LA RESISTENCIA NATURAL O GENÉTICA**

Los aspectos relacionados con la genética son también de interés en los programas de salud. Esto debe estar dirigido a la obtención de poblaciones con buena tasa de crecimiento, conversión alimenticia y resistencia a enfermedades. La selección intensiva para ciertos caracteres sin una base genética adecuada, da como resultado una pérdida de la "fortaleza" de los reproductores y, consecuentemente, efectos colaterales negativos.

Existen numerosos trabajos que apuntan al valor de las cepas resistentes genéticamente para reducir el problema de las enfermedades. El objetivo de la mejora genética desde el punto de vista de la prevención, es oponer a las causas de la enfermedad un terreno genético menos sensible o más refractario. Se pueden emplear métodos de selección, cruzamiento o manipulaciones genéticas.

De acuerdo a investigaciones realizadas en este campo habría cierta herencia en la resistencia a algunas enfermedades virales y bacterianas, observándose fuertes diferencias en la susceptibilidad entre los lotes.

Herman en 1970 hace una revisión de los métodos de prevención y control de enfermedades señalando que el trabajo inicial de producción de peces resistentes a enfermedades fue el de Embury y Hayford en 1925 quienes mediante apareamiento selectivo aumentaron la resistencia en trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) a la furunculosis. Luego cita a Wolf quien en 1954 inicio una investigación dirigida a desarrollar cepas de trucha café y de arroyo resistentes a la enfermedad ulcerativa y furunculosis, este trabajo fue continuado bajo la guía de Erlhinger en 1964 quien fue capaz de mostrar el aumento definitivo en la resistencia a la furunculosis en poblaciones seleccionadas cuando comparó con stock no seleccionados.

Posteriormente, se han logrado avances en la manipulaciones cromosómicas, en especial en la obtención de poblaciones de monosexo y triploidia en salmónidos, lo cual puede tener incidencia en la reducción del riesgo patológico. Parsons et. al, 1986 compararon el aumento de resistencia al IHNV de triploides obtenidos de hembras de trucha arcoiris y machos de salmón coho. En tanto que Bruno y Johnstone en un trabajo publicado en 1990 no encontraron diferencias consistentes en la susceptibilidad a *R. salmoninarum* entre diploides y triploides de salmon Atlántico.

Será de mucha utilidad el desarrollo de un programa de mejoramiento genético a largo plazo realizando un seguimiento a la descendencia para observar la inmunidad adquirida a ciertas enfermedades. Pero cabe tener en cuenta que la cepa o raza mas resistente a un patógeno no necesariamente lo es a otros. Sin embargo este tipo de técnica podría ser útil en áreas en que una determinada enfermedad es enzoótica.

## \* INMUNIZACIÓN

La inmunización con vacunas implica la incorporación artificial de antígenos, para suministrar inmunidad a los peces frente a eventuales nuevos contactos con dichos antígenos.

La vacunación es muy importante como una herramienta profiláctica primaria. Presenta varias ventajas, entre las que se mencionan:

1. Reducción de la dependencia de antibióticos y la resistencia resultante.
2. Mejoramiento de la sobrevivencia y la conversión de alimento.
3. Reducción de los costos de tratamiento.

El primer intento serio en desarrollar vacunas de peces, fue el trabajo de Duff en 1942, quien inmunizó trucha cutthroat (*Salmo clarki*) contra la furunculosis. Desde entonces, se han formulado vacunas experimentales contra casi la mitad de las bacterias patógenas de peces.

La aplicación de los procedimientos de inmunización requiere mucha investigación concerniente a:

1. Sistema inmune básico en peces.
2. Caracterización de respuestas inmunes protectoras.
3. Factores que influyen sobre la respuesta inmune en peces vacunados.
4. Factores biológicos que pueden impedir el uso de vacunas orales en ciertas especies de peces.

Los cultivadores de salmónidos confían que como producto de las investigaciones, se desarrollen vacunas virales, parasíticas o fúngicas. Por ahora existe un escaso número de vacunas desarrolladas y con licencia: Vibriosis, Hitra, Enfermedad Entérica de la Boca Roja y Furunculosis. En Chile sólo se cuenta con la autorización para vacunar contra *Yersinia ruckeri* y las empresas autorizadas por el registro del Servicio Agrícola y Ganadero para

operar con esta vacuna son tres, más una que se encuentra en trámite avanzado. Algunos de los nombres comerciales bajo los cuales se distribuyen son: Yenivac y Yersivacs.

Un punto conflictivo es el costo de las vacunas para los usuarios. En términos prácticos, los piscicultores necesitan controlar enfermedades específicas que los pueden afectar financieramente por causa de altas mortalidades y demandan productos baratos y fáciles de usar. Desde el lado opuesto, los fabricantes de vacunas necesitan mercados considerables para asegurar la rentabilidad de sus productos y esperan obtener precios elevados, para recuperar los costos de desarrollo y de licencia, y financiar los gastos de operación y la inversión futura. Además, siendo la industria de acuicultura comparativamente pequeña, los fabricantes están más dispuestos a invertir en desarrollar vacunas contra enfermedades de amplia prevalencia, más que para aquellas restringidas a pequeñas zonas geográficas o que corresponden a condiciones nuevas. Aunque los costos varían sustancialmente de un país a otro, sería una iniciativa interesante que una entidad gubernamental o particular interesada, las proveyera en forma gratuita, ya que en lugares donde una enfermedad está dispersa puede ser un buen incentivo para comenzar un programa de profilaxis general.

#### \* VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Son varias las vías de administración que han sido estudiadas, pero ninguna de las vacunas con licencia está autorizada para ser suministrada en forma oral debido a su baja eficacia.

Según el estudio realizado por Giorgetti (1991) en base a encuestas a varios países, las vacunas son administradas principalmente por inmersión, pero también por inyección, especialmente para inmunizar contra la vibriosis a los reproductores de salmónidos. En todo caso, el mismo estudio sugiere que es deseable un cambio en la vía de administración, proponiendo mejorar la administración por vía oral, que tiene la ventaja de evitar el estrés al pez y puede ser usada en ejemplares difíciles de capturar.

En la actualidad ya se proponen comercialmente formas de administración de vacunas orales que presentarían ventajas relacionadas con su absorción, dado que la cubierta protege el ingrediente activo y su formulación farmacéutica asegura la estabilidad del producto.

Por otro lado, es recomendable hacer pruebas con vacunas polivalentes (proposición en reunión de Asociación Europea de Ictiopatólogos, en Santiago de Compostella).

Los requisitos para lograr una buena inmunidad dependen de varias condiciones para su administración entre las que se destacan:

1. Propiedades del antígeno utilizado.
2. Vía y la dosis (dependientes del operador).
3. Parámetros independientes de la voluntad del operador, como son:
  - Temperatura, que condiciona la velocidad de respuesta.
  - Edad fisiológica de los peces.
  - Relación entre la talla del pez y el valor de la vacunación.
  - Estrés de la manipulación.
  - El azar.

#### \* **MEJORAMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE**

El complejo sistema inmune de los peces, con todas sus funciones interactuando en estado normal, debería ser capaz para mantener los individuos sanos. Sin embargo, la dinámica de susceptibilidad generada por el estrés del confinamiento provoca una constante inmunodepresión, surgiendo así la necesidad de emplear sustancias químicas que estimulen los mecanismos de defensa no específicos.

El uso de inmunoestimulantes, adjuvantes y portadores de vacuna, en cultivo de peces, ofrece un amplio rango de métodos atractivos para inducir y elevar la protección contra enfermedades inmunosupresoras.

Los inmunoestimulantes y adyuvantes pueden ser administrados antes o después de las vacunas para amplificar la respuesta inmunespecífica generando elevaciones del título de anticuerpos circulantes y el número de células que secretan anticuerpos. Además, los inmuestimulantes pueden ser usados solos, induciendo actividades elevadas en los mecanismos de defensa no específicos tales como actividad oxidativa aumentada de neutrófilos, actividad aumentada de englobamiento de células fagocitadas, potenciando células citotóxicas.

En aquellos casos donde los brotes de enfermedades son cíclicas y/o pueden predecirse, las pérdidas pueden ser reducidas elevando los mecanismos de defensa no específico y los inmunoestimulantes pueden ser usados anticipándose a los eventos para prevenir pérdidas por enfermedades, como puede ser el caso de aquellas enfermedades de difícil tratamiento.

### **Tipos de Inmunoestimulantes**

Uno de los primeros inmunoestimulantes utilizados en animales para elevar la respuesta inmunespecífica es el **adyuvante de Freund**, el que ha sido empleado con éxito, aplicado en conjunto con la inyección de bacterias atenuadas de peces.

Otros adyuvantes, inmunoestimulantes y modificadores de respuesta biológica que han sido usados en peces incluyen **glucanos, levamisol, baños de sal, liposacáridos bacterianos y Complejos vitamínicos C y E.**

Cada sustancia presenta problemas especiales en tiempo y métodos de administración (inyección, inmersión, oral por alimento, o mediante pulverización), ajuste de dosis por talla y especie de peces, estabilidad de almacenamiento y costos. Debe considerarse que los mecanismos de defensa no específicos y respuestas inmune en peces son altamente variables entre los individuos y la validación estadística requiere de un número de muestras apropiado y experimentos cuidadosamente controlados. Se debe tener especial cuidado en las advertencias de uso de estas sustancias ya que algunas de ellas pueden suprimir o alterar la vía biológica si son usados en forma inadecuada.

Investigaciones recientes definen las vías de acción de los inmunoestimulantes, adjuvantes y portadores de vacunas y ayudan a explicar cómo estas sustancias activan los mecanismos protectores en peces. En resumen, los inmunoestimulantes usados solos, encierran un gran potencial de uso en cultivos de peces, pisciculturas e instalaciones de cultivo para reducir las pérdidas por enfermedades infectocontagiosas.

Por otra parte, se probó que la vitamina C en las dietas era importante para controlar infecciones con *Edwardsiella tarda* (Durve and Lowell, 1982).

Se expone a continuación las características y efectos de algunas de las sustancias mencionadas:

1. **Glucanos** : Actúan potenciando la fagocitosis y producción de superóxidos, elevando los niveles de lisozimas en el suero y provocando una respuesta de anticuerpos, que en el caso de utilizar vacunas bacterianas es mayor y sostenida en el tiempo. La administración puede ser por inmersión o inyección, siendo la protección de ésta última de más larga duración. En todo caso, su efecto es muy dependiente de la dosis y del tiempo de aplicación. Siwicki y Anderson (1993) señalan que los glucanos en dosis bajas producen inmunoestimulación pero advierten que en dosis altas pueden causar inmunosupresión.
2. **Levamisol** : Aumenta la actividad fagocitaria de los neutrófilos. Se administra por inyección.
3. **Complejos Vitamínicos C y E**: Inducen la producción de anticuerpos humorales. La vitamina C estimula la actividad linfática y la vitamina E es considerada un componente estructural de la membrana mitocondrial microsomal y de la membrana externa de los eritrocitos, estimula la actividad del complemento.

\* **MEJORAMIENTO DE LA DIETA.**

Un área comparativamente abandonada, es la que estudia la influencia dietaria sobre la salud de los peces. Todavía hay muchas interrogantes, aunque se ha establecido que algunos suplementos dietarios son beneficiosos para la salud de los peces. Ketal (1983) descubrió que existe requerimiento de arginina y lisina para los alevines de trucha arco iris; la falta de este último aminoácido provoca la erosión de las aletas.

Paterson et al. 1981, discutieron la importancia de la nutrición en la manifestación del BKD en salmón del atlántico. Experimentos posteriores demostraron que el nivel de BKD puede ser reducido al alimentar los peces con niveles altos de elementos traza, en especial cobalto, cobre, yodo, hierro, fluor y manganeso, y reducir la cantidad de calcio.

La presencia de metales pesados, principalmente cobre, se indica como un factor iniciador de la vibriosis en anguilas; estos metales los pueden ingerir los peces de la dieta, o de la contaminación ambiental.

\* **MÉTODOS DE PREVENCIÓN PARA LAS ENFERMEDADES ESPECÍFICAS.**

A continuación se exponen los métodos de prevención específicos para las enfermedades de la boca roja y del agua fría, y aquellas enfermedades indicadas en este trabajo como de alto riesgo para las regiones en estudio.

**ENFERMEDAD BACTERIANA DEL RIÑÓN (BKD)**

**Agente etiológico:** *Renibacterium salmoninarum*

**Prevención** : Como consecuencia de los problemas prácticos para detectar la infección y monitorear en forma precisa su desarrollo, se ha progresado poco en encontrar tratamientos o medidas de prevención efectivas, en comparación a los avances hechos en el control de otras enfermedades bacterianas de peces.

El manejo juega un papel muy importante en la prevención de la transmisión

horizontal de esta enfermedad, en especial evitar las situaciones de estrés. Como medidas generales de prevención, se recomienda lo siguiente:

1. Mantener separados el alimento, materiales y equipos empleados en el manejo de los stocks enfermos y sanos.
2. El centro debe estar abierto únicamente al personal autorizado.
3. El personal debe higienizarse prolijamente a la entrada del Centro de cultivo. Utilizar yodóforo para las manos.
4. Se recomienda utilizar amonio cuaternario para: botas, trajes de agua, quechas y otro material inerte.
5. Para prevenir la transmisión vertical se recomienda la inyección intramuscular de eritromicina a los reproductores.

Algunos de los *R. salmoninarum* transmitidos por las ovas, pueden encontrarse en la yema y no ser destruidos por los desinfectantes. Sin embargo, al inyectar los adultos con eritromicina para reducir la mortalidad pre-desove, los niveles terapéuticos del antibiótico son depositados en la yema y pueden ser retenidos por dos o más meses después de la fertilización.

Un estudio reciente sugiere que una sola inyección de eritromicina en adultos de salmón chinook 1 o 2 meses antes de desove, reduce pero no elimina, infecciones con *R. salmoninarum* en el pez o sus ovas (Lee and Gordon, 1987).

Se recomienda hacer este tratamiento al menos un mes antes del desove, administrando una dosis de 20-30 mg/Kg peso pez. Si es posible, se recomienda aplicar 2 dosis; la primera, 2 meses antes del desove.

6. Otra medida de prevención sugerida, que implica un mayor costo, es la realización de un **screening** y desove individual, teniendo en consideración lo siguiente:

-Eliminar aquellos peces visiblemente enfermos.

-Tomar una muestra de riñón de los peces desovados para análisis en el laboratorio, con el fin de detectar la presencia del agente, teniendo especial cuidado en las hembras por considerárseles con una mayor

probabilidad de transmitir la enfermedad. La evidencia experimental sugiere que los machos contribuyen poco a la transmisión vertical de *R. salmoninarum*.

-Incubar en ambientes separados y con estrictas medidas sanitarias las ovas provenientes de reproductores negativos.

El desarrollo de técnicas más sensibles y cuantitativas para detectar BKD ayudará a conseguir mayor éxito en los estudios de segregación de stocks y otros programas de control de BKD. Se han desarrollado test rápidos de enzima-inmunoensayos (Elisa), para chequear gran número de muestras con máxima eficiencia. Se cree que ésta y nuevas técnicas diagnósticas, ayudarán a conocer el proceso de la enfermedad y facilitar el control del BKD.

7. Desinfección de la superficie de las ovas. Los yodóforos, a 25-100 mg/l por 5 min han probado ser efectivos para reducir la transmisión de la enfermedad, aunque no eliminan el patógeno de dentro de las ovas.

8. Obtención de cepas de peces genéticamente resistentes. Suzumoto et al. (1977) y Winter et al. (1979) reconocieron la importancia de este concepto y han entregado reportes sobre cepas resistentes.

### ENFERMEDAD ENTÉRICA DE LA BOCA ROJA (ERM)

Agente etiológico : *Yersinia ruckeri*

Prevención : El desarrollo de vacunas contra este agente, ha sido exitoso, llegando a desarrollarse vacunas orales. Actualmente se comercializa en Chile una vacuna fabricada con la cepa nacional *Y. ruckeri*.

La primera vacuna contra ERM fue de Ross y Klontz (1965), quienes la administraron vía el alimento, con gran éxito, logrando que un 90% de los peces vacunados sobreviviera al desafío posterior con *Y. ruckeri*.

En general, la aplicación de estas vacunas puede ser por vía oral, por inyección, por inmersión, ducha o spray. Con el método oral la protección es de corta vida; al compararlo con la inyección, (Anderson y Nelson, 1974) se encontró mayor título de anticuerpos en el segundo caso y el período de protección fue mayor.

Al comparar los métodos de inyección, inmersión, ducha y spray, se encontró que la inyección ofreció la mejor protección contra el desafío artificial con *Y. ruckeri*. Lamentablemente la inyección es un procedimiento limitado a peces grandes y/o valiosos y no para grandes grupos de alevines. Sin embargo, las vacunas contra ERM se han usado exitosamente mediante la administración por baño. En peces de 1,0; 2,0 y 4,0 gr, la inmunidad duró aproximadamente 4, 6 y 12 meses, respectivamente (Johnson y Amend., 1983). Existe también variación por especie: los salmones coho y sockeye retienen la inmunidad por más tiempo que el salmón rosado. Lamers y Muiswinkel (1984) concluyeron que ocurría una respuesta inmune secundaria 7 meses después del contacto primario con el antígeno, indicando la presencia de una memoria de larga vida.

Otras dos áreas en estudio son el uso de dietas mejoradas y de cepas de peces resistentes a esta enfermedad.

### **SEPTICEMIA RICKETTSIAL DE LOS SALMONIDOS**

**Agente etiológico** : *Piscirickettsia salmonis*

**Prevención** : Se debe tener en consideración las recomendaciones mencionadas para *R. salmoninarum*.

Ha dado buenos resultados el control total de todas las situaciones de estrés, esto es disminuir al máximo el levantamiento de redes, presencia de buzos, selecciones y tratamientos.

Además, se deben reforzar las medidas profilácticas: higiene de los operarios, uso de pediluvios y lavamanos con desinfectante, desinfección del material, eliminación periódica de los muertos en un pozo con cal o un incinerador.

### **NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN)**

**Agente etiológico** : Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa IPNV)

**Prevención** :Es válido lo mencionado para *R.salmoninarum*, en cuanto a transmisión horizontal y vertical, además de cuidar que el agua no esté contaminada con peces infectados.

Se debe exigir, al importar ovas, que todas las introducidas vengan certificadas libres de este virus, ya que la desinfección con yodóforos no es efectiva para eliminar el virus intraova.

La mejor profilaxis, es la desecación regular y desinfección de los estanques.

La desinfección profiláctica de los huevos de peces se lleva a cabo preferentemente con productos yodados como el Wescodyne y Betadine, que contienen el 1,6 y el 1% de yodo en solución orgánica; según Snieszko (1978), se emplean a 50 - 200 ppm y con un tiempo de acción de 10 - 15 minutos. Estos productos son tóxicos para los peces recién nacidos. La desinfección de ovas, según la reglamentación vigente, debe realizarse con una cantidad máxima por vez, de 250 ovas/l durante 10 min, con solución yodada de al menos 100 ppm/l de yodo libre, y cada litro de dicha solución no debe ser utilizada en más de 2000 ovas.

### **ENFERMEDAD DEL AGUA FRIA**

**Agente etiológico** : *Flexibacter psychrophilus*

**Prevención**: Se recomiendan las normas generales de prevención destacadas en este manual. Ante la posibilidad de contaminación de los huevos con este patógeno se sugiere, además, la desinfección con yodóforos, en concentraciones de 25 mg/l de yodo orgánico activo. La dosificación, según la legislación vigente, es la misma que la indicada en el caso anterior.

## 2. TRATAMIENTOS

### 2.1. Antecedentes

Los agentes quimioterapéuticos modernos se definen como productos químicos, que cuando se usan en el tratamiento de enfermedades infecciosas, destruyen efectivamente el agente causal y no dañan (o no lo hacen mayormente) a los peces o sus tejidos.

Técnicamente esta definición ideal incluye a los antibióticos, pero a causa de su naturaleza especial se les considera separadamente en los trabajos sobre el tema.

Antes de aplicar un tratamiento a los peces, se debe ver que se cumplan ciertas condiciones para que éste sea exitoso en eliminar el patógeno o atenuar su virulencia.

Antes que nada, se debe tener presente que las diversas terapias que existen, están dirigidas contra agentes antibacterianos y antiparasitarios; no existen tratamientos antivirales curativos. Para diseñar la terapia adecuada, primero se deberá analizar la facilidad de realizar un tratamiento considerando el número de peces a tratar. También se deben considerar los niveles de mortalidad, la prognosis de la enfermedad y el costo del tratamiento.

Una vez definido lo anterior, se deberá suministrar el medicamento adecuado, en la dosis y vía de aplicación correcta, por el tiempo y período recomendado. En general, se deben cumplir los siguientes requisitos:

- Indicación adecuada.
- Aplicación precoz.
- Dosis correcta.
- Esfuerzo terapéutico sostenido.

Además debe tenerse presente que los peces tienen que ser tratados en grupos y no individualmente.

## 2.2.- Indicaciones y metodología general de las terapias

Una clasificación general, permite diferenciar dos grandes tipos de terapias antibacterianas, de acuerdo al tipo de los productos químicos empleados:

### Tratamiento antiséptico

Corresponde al tratamiento externo del individuo mediante productos químicos, para eliminar un amplio espectro de gérmenes. Para ésto, se cuenta entre otros, con los yodóforos, que se emplean principalmente para la desinfección de ovas. Se puede agregar que también se emplean para sanitizar las manos de los operarios y como desinfectante de los materiales empleados en el desove.

Otro grupo de antisépticos lo constituyen los productos derivados del amonio cuaternario, que pueden administrarse mediante baño. Son eficaces contra infecciones superficiales y branquiales, sobre todo cuando se trata de *Myxobacterias*. La Cloramina T y formalina, se emplean también con este propósito.

### Antibioterapias

Se agrupan bajo este nombre las terapias con antibióticos, en su sentido estricto, y con las sustancias antibacterianas de síntesis que obedecen a las mismas reglas de empleo que los anteriores.

Los antibióticos inhiben o destruyen en forma selectiva los organismos patógenos, sin producir daño aparente al huésped que está siendo tratado. La acción puede ser bacteriostática o bactericida, dependiendo de su actividad propia o de la dosis aplicada.

Si la acción es bacteriostática, afecta la multiplicación del agente patógeno, retardando el proceso infeccioso de tal forma que el huésped puede recuperarse y aislar o destruir el micro-organismo.

Si es bactericida, actúa químicamente sobre el patógeno para finalmente destruirlo.

El tratamiento con antibiótico debe asegurar la eliminación de la población bacteriana causal de la enfermedad.

La vía de administración del medicamento debe ser la más adecuada para combatir el tipo de problema observado y depende además de la población que se desea alcanzar.

Las vías más apropiadas en la práctica para administrar terapia sobre una gran masa de peces, son los baños y, sobretodo, la incorporación al alimento, que supone la absorción digestiva de las drogas seleccionadas.

Debe hacerse una consideración económica de la terapia a emplear, lo que hace prohibitivo utilizar productos demasiado caros. Esto lleva a disponer de un número limitado de agentes antimicrobianos útiles para la acuicultura.

Los productos corrientemente prescritos se reducen a un número pequeño de familias: Tetraciclinas, Sulfamidas, Furanos y Quinolonas.

La elección puede ser aún más circunscrita por la prohibición de usar ciertos antibióticos en veterinaria, en especial si se contempla la exportación del producto final. La reglamentación más severa en la actualidad es la de EEUU.

La forma de terapia más común, es la adición de la droga en el alimento. El alimento, que sirve de vehículo en la terapia oral, debe distribuirse en tasas inferiores a la ración habitual, a fin de evitar perder medicamento y alimento, con el consiguiente daño económico y pérdida de la eficiencia del tratamiento. La terapia se prolonga por el período recomendado por el laboratorio (6 a 15 días, en general).

Es útil recordar que no todos los antibióticos tienen la misma eficiencia y que la desaparición de los efectos visibles de una infección, no implica la eliminación definitiva de los gérmenes responsables, por lo que es necesario continuar el tratamiento por el período recomendado inicialmente.

Finalmente, se debe destacar que los residuos de antibióticos pueden contaminar la canal de los peces destinados al consumo, problema que está directamente relacionado con la cinética de eliminación tisular de la droga.

Al respecto se han realizado varios estudios que han demostrado que su rapidez varía según la naturaleza química de cada sustancia, en un fenómeno en que también interviene la temperatura. La cual es un factor importante en la eliminación de la droga desde los tejidos del huésped. Las tasas de eliminación dependen, además, del tipo de droga y la especie del pez. El trabajo de Ellis (1991), resume el tiempo de eliminación de las drogas más comúnmente usadas en el control de las enfermedades de peces. Dichos tiempos han sido incorporados en el análisis de cada producto utilizado para el control de patógenos internos y están referidos como período de eliminación.

En forma general se ha determinado un máximo de 8 días para Cloramfenicol y los furanos, 3 semanas a 1 mes para las Tetraciclinas y Sulfamidas y no más de 48 a 72 horas para las Quinolonas (Kinkelin, 1991). Estos datos son útiles para permitir que los peces eliminen estas drogas antes de ser cosechados.

### Métodos de tratamiento

Se distinguen diferentes métodos de tratamiento, de acuerdo a la forma de aplicación del medicamento. Se pueden mencionar los siguientes:

#### Incorporación al alimento

En este caso el medicamento se aplica a través de la alimentación, para tratar enfermedades bacterianas y parasitosis internas. Es útil para tratar un número alto de peces, en forma relativamente fácil, ya que en general no se desvía la atención del personal de la rutina diaria de manejo y alimentación de un grupo, siendo la técnica terapéutica menos molesta para el cultivador y los peces.

La dosis aplicada al alimento depende de la biomasa de peces a tratar. En este tipo de tratamiento es importante conocer exactamente el número y peso promedio de los peces, de manera que el cálculo de la dosis a aplicar sea lo más real posible.

Posiblemente la mayor fuente de error provenga de la imposibilidad de alimentar con la misma cantidad proporcional de alimento, a todos los peces de una pileta o jaula, por lo que se debe prestar atención a alimentar de acuerdo a las técnicas correctas, para evitar que se sume este error.

#### **Precauciones:**

+ El medicamento debe mezclarse homogéneamente con el alimento para asegurarse que cada pez reciba la dosis recomendada. Para ello es recomendable agregar el medicamento junto con los ingredientes del alimento, durante la elaboración en la fábrica. Si la cantidad de alimento es baja, se obtiene buenos resultados al prepararlo el propio cultivador, mezclando el medicamento con un pequeño porcentaje de aceite ( 2-3% ) y homogenizándolo en el alimento.

+ Antes de iniciar la terapia, es recomendable dejar a los peces sin alimentar por 24 horas como mínimo, de tal forma que el alimento medicamentado sea totalmente consumido sin que disminuya la ingesta por problemas de sabor que afecten su aceptabilidad, más aun cuando la fracción enferma de la población puede estar inapetente por causa de la patología.

## Tratamientos en baños medicamentados

Estos tipos de tratamientos son de gran elección porque permiten tratar efectivamente una amplia gama de patologías, que cubren desde parasitosis externas a infecciones bacterianas externas. Son utilizados con mucho éxito para infecciones con *Myxobacteria*.

Los tratamientos por baños se pueden clasificar en varios tipos, según su forma de aplicación, la que dependerá del medicamento empleado y del tipo de patógeno que se combate.

### Baño por inmersión

Se usa una solución medicamentada muy concentrada, en un pequeño estanque, en donde se sumergen los peces por un tiempo breve (15 a 45 segundos, con un máximo de 3 minutos).

A causa de la concentración, el tratamiento es muy estresante y los peces muy débiles o extremadamente enfermos, probablemente mueran como consecuencia de él.

En general es muy efectivo para tratar ectoparásitos.

Este tipo de tratamiento se utiliza con cantidades pequeñas de peces o para vacunación.

Se debe tener la precaución de oxigenar el agua antes de tratar cada lote.

### Baño con flujo constante

En este caso se agrega por goteo una solución concentrada del medicamento a la entrada del agua al sistema, para que fluya a través de la pileta o canal por un tiempo determinado.

Se utiliza ampliamente para el tratamiento de ovas. También se emplea para el tratamiento de alevines contra parásitos externos.

Tiene la ventaja sobre el baño por inmersión, de que los peces no sufren manejo.

Durante el tratamiento, debe controlarse especialmente que se está realizando una buena mezcla del medicamento, en la zona de goteo.

### **Baño con flujo detenido**

Se cierran la entrada y salida de agua del estanque o pileta que se va a tratar, y se calcula el volumen de agua involucrada. Se agrega la solución del medicamento por el período recomendado, que por lo general es una hora. La mayor ventaja que presenta sobre el baño corto por inmersión, es que no requiere manejar los peces.

#### **Recomendaciones:**

- + Al igual que en todos los manejos violentos y estresantes, dejar los peces sin alimentar previo a la aplicación del tratamiento.
- + Oxigenar o airear el medio.
- + Conocer lo más exactamente posible el volumen de agua a emplear, para calcular en forma real la cantidad de medicamento a aplicar.
- + Previo al tratamiento:
  - a) retirar todos los peces muertos y moribundos, para controlar claramente una eventual acción tóxica del medicamento.
  - b) probar la solución terapéutica con un grupo pequeño de peces, para controlar que no se ha cometido un error de cálculo en la concentración, o se esté en presencia de factores ambientales o químicos tóxicos.
- + Revisar y controlar las condiciones físicas y químicas del agua. Controlar el pH de acuerdo a las especificaciones recomendadas por el laboratorio que expende el medicamento, de otra forma, el medicamento podría precipitar o producir subproductos tóxicos. En caso que la luz afecte al medicamento, el tratamiento debe hacerse en la oscuridad.
- + Realizar este tipo de tratamiento a primera hora de la mañana, para minimizar el estrés y tener la oportunidad de observar la evolución de los peces el resto del día.

+ El período de aplicación del tratamiento debe ceñirse estrictamente a los recomendado y, en caso de observar anomalías o signos de intoxicación, suspender el tratamiento, restablecer el flujo de agua y oxigenar o airear el medio.

### Tratamientos por inyección

La vía parenteral es la más efectiva y directa disponible para la administración de medicamentos y desde 1950 ha sido concebida para ser empleada en peces (Kinkelin et al, 1991). Sin embargo, por el elevado esfuerzo que requiere, con el consiguiente costo de mano de obra involucrado, estos tratamientos se aplican preferentemente a un número reducido de peces de alto valor económico: reproductores, grupos de experimentación, etc. Este criterio cambia si se dispone de máquinas inyectoras automáticas, y/o si la mano de obra no es especialmente cara y un estudio de costo lo permite.

El medicamento puede inyectarse por diferentes rutas, de las cuales las más importantes se describen a continuación.

### Vía subcutánea

Tiene la desventaja de que la piel del pez no es lo suficientemente flexible como la de otros animales, y después de la inyección, parte del medicamento se proyecta hacia afuera, provocando pérdidas difíciles de cuantificar y controlar (Herwing, 1979).

La inoculación (subcutánea dorsal), se aplica en el **sinus dorsalis**, interespacio que se ubica entre el tejido subcutáneo grueso superior del lomo en dirección de la aleta dorsal y la pared muscular blanda bajo éste.

En truchas mayores de 15 cm, el área de inoculación se ubica en la zona alrededor de 1 cm anterior a la aleta dorsal. La aguja se inserta en forma levemente oblicua y hacia adelante de la aleta dorsal. Luego de inoculado, la aguja debe removerse suavemente con el fin de evitar el goteo desde el tejido y la pérdida del inóculo desde la zona de punción.

### **Intraperitoneal**

Es el método más recomendado de inyección, siendo mucho más fácil de efectuar que la inyección intramuscular o subcutánea. Se requiere que el medicamento aplicado sea altamente absorbible y capaz de pasar a través de la pared intestinal (y otras barreras) e ingresar al sistema del pez. Es la vía recomendada para la vacunación, porque ofrece un método rápido para la absorción del antígeno.

### **Intramuscular**

Esta vía presenta la ventaja de una más constante y lenta difusión del antígeno o vacuna, lo que permite estimular la producción de anticuerpos. Sin embargo, para el caso de algunos medicamentos, la absorción es demasiado lenta y toma mucho tiempo en hacer algún efecto terapéutico en el pez. Por otra parte, quedan zonas alrededor de la inyección que presentan una mayor concentración de antibiótico, las que pueden necrosarse por este efecto. Esto ocurre, por ejemplo, para el caso de la oxitetraciclina y las sulfonamidas.

### **Tratamientos por pulverización**

La técnica consiste en pulverizar en un aerosol la suspensión de vacuna sobre los peces, mientras son sostenidos fuera del agua. En un sistema automatizado, para manejar grandes cantidades de peces, éstos circulan sobre una correa transportadora.

### 2.3. Productos utilizados para el control de patógenos internos

#### Acido oxolánico

Antibacteriano sintético perteneciente al grupo de las 4-Quinolonas. Es especialmente recomendado para tratar septicemias bacterianas, furunculosis y vibriosis. También para el tratamiento de enfermedad columnaris (*Flexibacter columnaris*) y boca roja (*Yersinia ruckeri*).

La dosis recomendada es 10 mg/Kg pez/día durante 10 días y la tasa de eliminación a 10°C es de 18 días.

#### Dinofloxacin

Antibiótico perteneciente a la familia de las quinolonas. Se aplica en dosis de 15 a 20 mg/kg. Tiene acción de amplio espectro.

#### Enrofloxacin

Antibiótico perteneciente a la familia de las quinolonas. Se aplica intraperitonealmente en dosis de 15 a 20 mg/kg. Se recomienda aplicar en dos dosis para combatir el BKD en reproductores. La segunda inyección se aplica 45 días después de la primera.

#### Eritromicina

Tiocianato de eritromicina, antibiótico macrólido.

Droga de elección para tratar la enfermedad bacteriana del riñón (*Renibacterium salmoninarum*).

Se administra, vía oral en dosis de 100 mg/Kg pez/día, durante 14-21 días y por inyección en dosis de 10-30 mg/Kg de peso corporal, 30 días antes del desove para el tratamiento preventivo del BKD.

Respecto a la tasa de eliminación sólo se tiene información que, después de inyectar 20 mg/kg, en salmón Chinook, a 10°C, los niveles en el fluido ovárico no fueron detectables después de 20 días. El límite detectable por el ensayo fue de 0.26 µg/ml.

### Flumequina:

Antibacteriano perteneciente a la familia de las Quinolonas fluoradas.

Está indicado especialmente para el control de furunculosis, vibriosis y yersinosis.

Se administra, vía oral en dosis de 12 mg/Kg peces, por 6 días consecutivos.

La tasa de eliminación a nivel de tejido muscular es de 72 horas, persistiendo sólo niveles bajos en las branquias.

### Oxitetraciclina

Util para el control de la furunculosis causada por *Aeromonas salmonicida*, la septicemia hemorrágica bacteriana causada por *Aeromonas liquefaciens* y las enfermedades causadas por *Pseudomonas sp.*

Se administra, vía oral en dosis de 75 mg/Kg pez, por día durante 10 días.

La tasa de eliminación es de 60 días sobre 10°C y 90-100 días con temperaturas bajo 6 o 7°C.

### Sulfadoxina y Trimetoprim

Antibacteriano de acción bactericida y sinérgica de amplio espectro. La sulfa inhibe la síntesis de ácido fólico, al participar en competencia de sustrato con el PABA; el trimetoprim inactiva la acción bacteriana del ácido fólico.

Indicado contra la furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), enfermedad del agua fría (*Flexibacter psychrophilus*), enfermedad columnar (*Flexibacter columnaris*), boca roja (*Yersinia ruckeri*), vibriosis (*Vibrio anguillarum*) y otras enfermedades producidas por *Edwardsiella*, *Flexibacter*, *Pasteurella* y *Renibacterium*.

Se administra, vía oral en dosis de 30 mg de ingredientes activos/Kg-peze, por 5 días consecutivos.

La tasa de eliminación es prolongada a temperaturas bajo los 10°C (no menos de 60 días).

## 2.4. Productos utilizados para el control de patógenos externos

### Cloramina T

Desinfectante y germicida de amplio espectro. Utilizado para combatir la Enfermedad Bacteriana de las Branquias y contra *Ichthyophthirius multifiliis*.

La administración se realiza por baño en una dosis de 6-12 ppm por 1 hr, durante 2 o 3 días consecutivos.

### Cloruro de Benzalconio

Detergente, bactericida, fungicida.

Se utiliza como tratamiento de enfermedades de las branquias.

La administración se realiza por baño a 2 ppm de producto activo durante una hora, por hasta 4 días consecutivos.

### Formol

Bactericida, fungicida y viricida

Se utiliza contra parásitos externos, bacterias, hongos, virus.

Se administra a una dosis 160 ppm por 10 a 15 min. Se aplican al menos 2 tratamientos en un intervalo de 2 a 3 días.

### Neguvon

Insecticida útil contra copépodos.

Se administra por baño, a una dosis de 1 ppm durante una hora, 1 vez a la semana, durante 3 semanas consecutivas.

## BIBLIOGRAFIA

- Anderson, D.P. y J.R. Nelson. 1974.** Comparison of protection in rainbow trout *Salmo gairdneri* inoculated with and feed Hagerman redmouth bacterins. J. Fish. Res. Bd. Canada, 31: 214-216.
- Bruno D.W. y R.Johnstone. 1990.** Susceptibility of diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to challenge by *Renibacterium salmoninarum*. Bull. Eur. Ass.Fish Pathol. 10(2):45-46.
- Duff, D.C.B. 1942.** The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. J.Immunol. 44: 87-94.
- Durve, V. S. y R.T. Lowell. 1982.** Vitamin C and diseases resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Can.J. Fish. Aquat. Sci. 39: 948-951.
- Ellis, A.E. 1991.** Tissue residues of chemotherapeutans in Fish. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 11(1): 22-29.
- Giorgetti, G. 1991.** Current usage of commercial vaccines in fisf and shellfish culture. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 11(1):41-45.
- Herwing, N. 1979.** Handbook of drugs and chemicals used in the treatment of fish diseases: A manual of fish pharmacology and material medica. Spriengfield, Illinois, C.O.Thomas. 272pp.
- Herman R.L. 1970,** Prevention and Control of Fish Diseases in Hatcheries. A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes. F.Sniesko Ed. Spec.Publication (5), American Fisheries Society, Washington D.C.:pp 3-15
- Inglis, V., R.J.Ronal, N.R. Bromage. 1993.** Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Scientific Publications. Osney Mead, Oxford. Great Britain. 311 pp.
- Johnson, K.A. y D.F. Amen. 1983.** Efficacy of *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. J. Fish Diseases 6 : 473-476.
- Ketal, H.G. 1993.** Requirement for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout. Journal of Animal Science 56: 101-107.

- Kinkelin, P., y R.P. Hendrick. 1991.** Dilemmas of disease control policies. *Bull.Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11(1): 3-7.
- Lamers, C.H.J. y W.B. Muiswinkel. 1984.** Primary and secondary immune responses in carp (*Cyprinus carpio*) after administration of *Yersinia ruckeri* 0-antigen **en:** *Acuigrup* (eds.) *Fish Diseases. Editorial ATP. Madrid.* pp. 119-127.
- Lee, E.G.H. y M.R. Gordon. 1987.** Immunofluorescence screening of *Renibacterium salmoninarum* in the tissues and eggs of farmed chinook salmon spawners. *Aquaculture*, 65: 7-14.
- Parsons J.E., R.A.Busch, G.H.Thorgaard y P.D.Scheerer, 1986.** Increase Resistance of Triploid Rainbow Trout x Coho Salmon Hybrid to Infectious Hematopoietic Necrosis Virus. *Aquaculture*, 57:337-343.
- Paterson, W.D., S.P.Lall y D. Desautels. 1981.** Studies on Bacterial kidney disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Canada. *Fish Pathology* 15: 283-292.
- Ross A.J. y G.W. Klontz. 1965.** Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against an etiologic agent of "red mouth". *J.Fish. Res.Bd. Can.* 22(3): 713-719.
- Siwicki, A.K. y D.P. Anderson. 1993.** Development of in vitro tests to screen potential immunoestimulants: Dosage effect of a Glucan and Chitosan on splenic cells from Rainbow Trout. **en:** International Workshop and Training Course in Poland. "Application of Biodefence System for Fish Diseases Control". August 23 - August 27. Inland Fishery Institute .[Abstracts].
- Snieszko, S.F. 1972.** Progress in fish pathology in this century. *Symposium of the Zoological Society of London*, 30:1-14.
- Suzumoto, B.K., Schreck, C.B. y J.D. McIntyre. 1977.** Relative resistance of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 34:1-8.
- Winter, G.W., C.B.Schreck y J.D. McIntyre. 1979.** Resistance of different stocks and transferrin genotypes of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*, and steelhead trout, *Salmo gairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis. *Fishery Bulletin* 77:795-802.

## INDICE DE MATERIAS

Pág.		
	INTRODUCCION .....	2
	1. PREVENCIÓN .....	4
	METODOS DE PREVENCIÓN .....	4
	Prevención del contacto entre patógeno y huésped .....	4
	1. Intervención puntual .....	4
	2. Intervención coordinada .....	7
	Incremento de la resistencia natural o genética .....	8
	Inmunización .....	10
	Vías de administración .....	11
	Mejoramiento de la respuesta inmune. ....	12
	Mejoramiento de la dieta .....	15
	METODOS DE PREVENCIÓN PARA LAS ENFERMEDADES ESPECÍFICAS .....	15
	Enfermedad Bacteriana del Riñón .....	15
	Enfermedad Entérica de la Boca Roja .....	17
	Septicemia Rickettsial de los Salmónidos .....	18
	Necrosis Pancreática Infecciosa .....	19
	Enfermedad del Agua Fría .....	19
	2. TRATAMIENTOS .....	20
	2.1 Antecedentes .....	20
	2.2 Indicaciones y metodología general de las terapias .....	21
	Tratamiento antiséptico .....	21
	Antibioterapias .....	21
	Métodos de tratamiento .....	24
	Incorporación al alimento .....	24
	Tratamientos en baños medicamentados .....	25
	Tratamientos por inyección .....	27
	Tratamientos por pulverización .....	28
	2.3 Productos utilizados para el control de patógenos internos .....	29
	2.4 Productos utilizados para el control de patógenos externos .....	31
	BIBLIOGRAFIA .....	32