



FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA

INFORMES TECNICOS F I P

FIP - IT / 2001 - 09

INFORME : TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE
FINAL : ENFERMEADES DE SALMONIDOS,
(TOMO I) MITILIDOS, PECTINIDOS Y OSTREIDOS

UNIDAD : UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
EJECUTORA

PROYECTO FIP N° 09/2001

**“ TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO DE
ENFERMEDADES DE SALMONIDOS, MITILIDOS,
PECTINIDOS Y OSTREIDOS”**

INFORME FINAL

Unidad Ejecutora

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR**

Investigador Principal:

Investigadores Asociados:

Mariel Campalans B.

Patricia Rojas Z.

Jacqueline Campalans B.

Inés Guerrero S.

Subcontrato

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Co-Investigador:

Técnico

Sandra Bravo S.

Ximena Figueroa L.

2002

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
• Objetivo General	3
• Objetivos Específicos	3
Objetivo 4.1	
Analizar información científico tecnológica, nacional e internacional relacionada con las enfermedades de organismos acuáticos actualmente en cultivo en Chile	4
1.1. Antecedentes	4
• Enfermedades de Salmónidos cultivados en el país	5
• Enfermedades de Moluscos cultivados en el país	8
• Enfermedades de importancia internacional	9
• Categorización de enfermedades	11
1.2. Desarrollo Metodológico y Resultados	14
Propuesta de Categorización de Enfermedades de Salmónidos	27
Propuesta de Categorización de Enfermedades de Moluscos	29
Objetivo 4.2	
Analizar información científica y procedimientos técnicos, nacional e internacional, en relación al diagnóstico de las enfermedades de recursos hidrobiológicos en cultivo	31
2.1. Antecedentes	31
2.1.1. Examen Clínico	31
2.1.2. Diagnóstico Presuntivo	32
2.1.3. Identificación confirmatoria del agente patógeno	34
2.2. Desarrollo Metodológico	37

Objetivo 4.3

Analizar, en forma comparativa, las técnicas de diagnóstico utilizadas, nacional e Internacionalmente, para cada una de las enfermedades descritas en el

objetivo 4.1	44
3.1. Antecedentes	44
3.1.1. Clasificación de las Técnicas de Diagnóstico	48
• Histológicas	48
• Microbiológicas	49
• Inmunológicas	49
3.1.2. Elección del Método de Diagnóstico	57
3.2. Desarrollo Metodológico	58
3.2.1. Propuesta de Jerarquización de Técnicas de Diagnóstico	59
3.2.2. Frecuencia de uso de las Técnicas a nivel nacional	61
3.2.3. Encuesta Técnica	62
3.2.3.1. Procedimientos para toma y mantención de muestras	62
3.2.3.2. Procedimientos Virales	64
3.2.3.3. Procedimientos Bacterianos	65

Objetivo 4.4

Proponer protocolos estandarizados para las diferentes técnicas de diagnóstico

de enfermedades de recursos hidrobiológicos en nuestro país	68
4.1. Antecedentes	68
4.2. Desarrollo Metodológico	68
4.2.1. Manual de Procedimientos	69
4.2.2. Seminario Taller	70
4.2.3. Revisión de Procedimientos de Acreditación de Laboratorios	72
4.2.3.1. Normas nacionales e internacionales relacionadas con los laboratorios de Diagnóstico	73
4.2.3.2. Requerimientos técnicos asociados a los laboratorios de diagnóstico	75

Introducción

Chile ha ido implementando en forma creciente la actividad de acuicultura como base de sustentación del desarrollo pesquero. Es así como las divisas que provienen del sector acuícola significan casi el 50% del total de las exportaciones pesqueras del país (Wurmann, 2000).

La situación artificial en que es mantenida cualquier especie en cultivo, tiende a favorecer la aparición y proliferación de enfermedades llegando a ser, en ocasiones, una importante causa de mortalidad y pérdidas económicas. En este aspecto, es importante el impulso que se ha dado al desarrollo de tecnologías y manejos destinados a controlar las pérdidas atribuidas a enfermedades.

Desde el punto de vista sanitario, las enfermedades originadas por agentes infecciosos suelen ser las que revisten mayor importancia, por las implicancias epidemiológicas, las que pueden ser potenciadas por un manejo inadecuado del cultivo.

En Chile, el primer incidente documentado de enfermedades afectando a peces salmónidos lo realizó Wood (1970), al registrar la presencia de 2 ó 3 parásitos y un par de enfermedades bacterianas en perca trucha, truchas y salmones. En estos últimos, detectó además, una peligrosa enfermedad característica sólo de salmones, la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), la que se diseminó desde Río Blanco (V Región), a las pisciculturas de Polcura y Lautaro y a otras zonas donde se liberaron peces sobrevivientes, constituyendo éste, el primer registro de introducción y diseminación de una enfermedad exótica (Snyder, 1971).

Desde entonces, las enfermedades más importantes, registradas en publicaciones y que han tenido un serio efecto económico para la industria de cultivo de salmones, se encuentran en el

documento *Historia del Registro de las Enfermedades de Salmónidos y Moluscos en Chile*, que constituye el Anexo 1 del presente informe.

En moluscos, el conocimiento de las enfermedades que afectan su cultivo está menos desarrollado que en el caso de los peces; en parte, esto se debe a que es un área poco estudiada en la medicina animal (Elston, 1994). En este aspecto, las técnicas de diagnóstico para la detección de virus en moluscos, es quizás una de las que muestra menor avance, debido al escaso desarrollo en el área del cultivo celular y de tejidos de estos organismos, debiéndose utilizar microscopía electrónica para su detección. Las detecciones precoces de enfermedades son difíciles de llevar a cabo, porque no se han desarrollado procedimientos de diagnóstico inmunológicos.

El primer reporte de enfermedad en moluscos en el país, aparece en la publicación de Mix & Breese (1980), donde se documenta la aparición del *desorden proliferativo celular* en ostras de Chiloé. Otras enfermedades reportadas en publicaciones se describen en el Anexo I.

En el actual estado de desarrollo de los cultivos acuícolas nacionales, es necesario y oportuno conocer su estado sanitario, contar con la información más completa y actualizada sobre los laboratorios de diagnóstico de enfermedades de especies de cultivo acuícola y las técnicas por ellos empleadas para la detección de los diferentes agentes registrados, como también un listado completo de los hallazgos de agentes causantes de enfermedades, realizados por laboratorios nacionales y extranjeros. Al mismo tiempo, un esfuerzo por estandarizar las técnicas de diagnóstico, permitirá actuar bajo un criterio común y definido para favorecer la mantención de áreas libres de patógenos teniendo en consideración que, en ocasiones, el traslado de material biológico es imprescindible.

La estandarización de las técnicas de diagnóstico de enfermedades de recursos hidrobiológicos, permitirá una uniformidad de criterios para un adecuado diagnóstico de los agentes patógenos y facilitará el reconocimiento del estado sanitario en Chile, por parte de organismos internacionales.

Para cumplir con esta tarea, se deberá impulsar la utilización de métodos normalizados, tanto en protocolos de técnicas como en acreditación de laboratorios de diagnóstico.

Objetivos

❖ **Objetivo General**

Evaluar las técnicas de diagnóstico de enfermedades de importancia productiva en recursos hidrobiológicos, utilizadas por los laboratorios especializados en el país.

❖ **Objetivos Específicos**

- 4.1 Analizar información científico tecnológica, nacional e internacional, en relación a las enfermedades de organismos acuáticos actualmente en cultivo en Chile.
- 4.2 Analizar información científica y procedimientos técnicos, nacional e internacional, en relación al diagnóstico de las enfermedades de recursos hidrobiológicos en cultivo.
- 4.3 Analizar, en forma comparativa, las técnicas de diagnóstico utilizadas nacional e internacionalmente, para cada una de las enfermedades descritas en el objetivo específico 4.1.
- 4.4 Proponer protocolos estandarizados para las diferentes técnicas de diagnóstico de enfermedades de recursos hidrobiológicos en nuestro país.

Objetivo 4.1 :

Analizar información científico tecnológica, nacional e internacional, en relación a las enfermedades de organismos acuáticos actualmente en cultivo en Chile

1.1. Antecedentes

Teniendo en cuenta lo publicado por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) en su Anuario Estadístico 1999, y que se resume en el Cuadro N°1, se puede afirmar que en Chile se cultiva la totalidad de las especies de salmónidos, mitílidos, pectínidos y ostréidos considerados en el proyecto.

Cuadro N°1: Cosecha de Centros de Acuicultura en 1999, por especie.

ESPECIE	Total Cosecha [ton]
Pelillo	31278
Lenguado	1
Salmón del Atlántico	103242
Salmón plateado	76324
Salmón Rey	208
Trucha Arco Iris	50414
Turbot	333
Abalón Rojo	48
Cholga	566
Chorito	16203
Choro	477
Ostión del Norte	20668
Ostra Chilena	291
Ostra del Pacífico	5441
Erizo	2
TOTAL	305496

Fuente: Adaptado de ANUARIO ESTADÍSTICO DE PESCA 1999, Sernapesca, Pág.102

Las enfermedades que en la actualidad se presentan en dichos organismos acuáticos, han sido reportadas a través de diversos medios de difusión científica y tecnológica y, a partir de 1998, registradas por el programa de vigilancia epidemiológica desarrollado por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca), labor realizada fundamentalmente con los datos de información mensual enviados por los laboratorios de diagnóstico reconocidos por este servicio.

La información está referida principalmente a peces salmónidos, puesto que la mayor parte de los laboratorios de diagnóstico están asesorando más estrechamente a esta industria.

Las enfermedades clasificadas por Sernapesca, que deben ser reportadas por los laboratorios adscritos al programa de vigilancia, se encuentran en el Cuadro N°2 e incluyen enfermedades presentes y ausentes en el país.

Las enfermedades consignadas en esta lista, corresponden en parte a las enfermedades de declaración obligada a la OIE y a aquellas enfermedades señaladas como peligrosas por la OIE. Además, incluyen algunas enfermedades que son de amplia distribución y poca selectividad de huéspedes, como *Vibrio spp.* o *V. anguillarum* (Teuber et al., 1990), que han sido reportadas en *Mytilus chilensis* y salmones coho. En su estudio, los autores señalan que serían cepas de baja capacidad patogénica.

*** Enfermedades de Salmónidos cultivados en el país**

Los patógenos que han sido reportados, desde el inicio del programa de vigilancia de patologías de organismos acuáticos impulsado por Sernapesca hasta la fecha, se listan en el Cuadro N°3. La mayoría de ellos se caracteriza por estar distribuidos en todas las áreas en donde se cultiva el salmón.

Cuadro N°2: Enfermedades y agentes a notificar a Sernapesca

ENFERMEDAD	AGENTE ETIOLOGICO
Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHN)	Virus de la IHN
Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHN)	Virus de la EHN
Enfermedad Viral del Oncorhynchus masou (OMV)	Virus del <i>Oncorhynchus masou</i>
Septicemia Hemorrágica Viral (VHS)	Virus de la VHS
Encefalopatía y Retinopatía Viral/Necrosis Nerviosa Viral (VNN)	Virus de la VNN
Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)	Virus del IPN
Anemia Infecciosa del Salmón (ISA)	Virus de la Anemia Infecciosa
Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD)	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
Piscirickettsiosis (SRS)	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
Yersiniosis	<i>Yersinia ruckeri</i>
Flavobacteriosis (internas/externas)	<i>Flavobacterium spp.</i> <i>F. psychrophilum</i> <i>F. columnare</i> <i>F. aqualitis</i> <i>F. hutchinsoni</i>
Furunculosis	<i>Aeromonas salmonicida</i>
Vibriosis de Agua Fría/ Enfermedad de Hitra	<i>Vibrio salmonicida</i>
Vibriosis	<i>Vibrio ordali</i> <i>Vibrio anguillarum</i>
Anemia Marina/Leucosis Plasmacitoidea/Leucosis	Virus de la Leucemia del salmón
Linfoblástica/Leucemia Linfoblástica	Nucleospora (<i>Enterocitoozon salmonis</i>)
Necrosis Eritrocítica Viral (VEN)	Virus de la VEN
Síndrome Eritrocítico de Cuerpos de Inclusión (EIBS)	Virus de la EIBS
Bonamiosis	<i>Bonamia sp.</i> <i>Bonamia ostreae</i>
Haplosporidiosis	<i>Haplosporidium nelsoni</i> <i>H. costale</i> <i>H. amoricarum</i> <i>Haplosporidium spp.</i>
Marteiliosis	<i>Marteilia refrigens</i> <i>M. sydneyi</i>
Microcytosis	<i>Mikrocytos mackini</i> <i>M. roughleyi</i>
Perkinsosis	<i>Perkinsus marinus</i> <i>P. atlanticus</i> <i>P. olseni</i>
Enfermedad Viral del Velo de la Ostra	<i>Iridovirus</i>

Fuente: Programa de Vigilancia epidemiológica. Manual de procedimientos. Sección 5, Sistema de Información Epidemiológica, Departamento de Sanidad Pesquera, SERNAPESCA, Marzo del 2000

Cuadro N°3: Patógenos de salmónidos actualmente presentes en Chile, registrados por Sernapesca

PATÓGENOS	ESPECIE HUÉSPED
<p><u>Bacterianos</u></p> <p><i>Renibacterium salmoninarum</i> <i>Piscirickettsia salmonis</i> <i>Flavobacterium spp.</i> <i>Flabobacterium columnare</i> <i>Flavobacterium psychrophilum</i> <i>Flexibacter maritimus</i> <i>Flavobacterium aqualitis</i> <i>Flavobacterium hutchinsonii</i> <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Vibrio spp</i> <i>Aeromonas spp.</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida atípica</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus spp</i> <i>Enterococcus sp.</i></p>	<p>Todos salmonidos O. mykiss, O. kisutch, S. salar O. mykiss, O. kisutch, S. salar O. mykiss, S. salar O. mykiss, O. kisutch, S. salar O. mykiss, O. kisutch O. mykiss, S. salar O. kisutch O. mykiss, O. kisutch, S. salar O. mykiss, O. kisutch, S. salar O.mykiss O. mykiss, S. salar S.salar O. mykiss, S. salar O.kisutch S. salar S.salar</p>
<p><u>Virales</u></p> <p><i>Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)</i> Leucosis linfoblástica</p>	<p>O. mykiss, O. kisutch, S. salar O.kisutch</p>
<p><u>Protozoarios</u></p> <p><i>Ichtyobodo necatriz</i> <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> <i>Chilodonella spp.</i> <i>Hexamita spp.</i> <i>Microsporidium spp.</i> <i>Nucleospora salmonis</i> <i>Kudoa sp</i></p>	<p>S. salar S. salar S. salar O.mykiss, O. kisutch O.mykiss Todos los salmónidos S.salar</p>
<p><u>Crustáceos</u></p> <p><i>Caligus spp</i> <i>Ergasilus sp.</i> <i>Cerathotoa</i></p>	<p>Todos los salmónidos S.salar S.salar</p>

Fuente: Programa de Vigilancia Epidemiológica en Acuicultura de Sernapesca (Informes Julio-Diciembre 1998, Enero-Junio 1999, Agosto-Diciembre 1999 y Enero-Junio 2000).

Entre las patologías de importancia, reportadas a Sernapesca y presentes en Chile, se puede señalar a:

- ❖ La Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD)
- ❖ La Piscirickettsiosis
- ❖ La Necrosis Pancreática Infecciosa, IPNV
- ❖ La Flavobacteriosis (RTFS)
- ❖ La Microsporidiosis
- ❖ La Furunculosis atípica.

De las restantes patologías presentes en Chile y listadas por el Sernapesca, algunas son fácilmente controladas a través de medicamentos, como es el caso de los parásitos externos; otras, como la yersiniosis, son prevenidas a través de vacunas, o simplemente corresponden a patógenos oportunistas, de amplia distribución en los cuerpos de agua y que se hacen presentes solamente bajo malas prácticas de cultivo o condiciones adversas para el pez, como ocurre con las bacterias *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.* y *Vibrio spp.*, abundantes en el medio acuático.

* **Enfermedades de Moluscos en cultivo en el país**

El conocimiento de las enfermedades que afectan a los moluscos de cultivo está menos desarrollada que en el caso de los salmónidos. Los registros de parásitos en poblaciones naturales, Carvajal (1988), Oliva et al. (1986) y el reporte del *desorden proliferativo celular* en ostras de Chiloé realizado por Mix y Breese en 1980, dan inicio al conocimiento de los problemas sanitarios en moluscos de bancos naturales. Posteriormente, Riquelme et al. (1995) inicia la publicación de la investigación realizada en problemas bacterianos de los cultivos larvales del ostión del norte.

El primer estudio referido al estado sanitario de moluscos de cultivo que contempla larvas, juveniles y adultos, se realizó mediante el proyecto FIP 95/32 ejecutado por la Universidad Católica de Valparaíso y permitió conocer los problemas patológicos de siete especies de cultivo en la X región y una de la IV región del país. Para la detección de las anomalías se realizaron cortes histológicos, los cuales permitieron la observación de siete condiciones patológicas (Campalans et al. 1997).

Posteriormente, a partir de los descubrimientos de este primer catastro de enfermedades de moluscos de cultivo, fueron publicados los trabajos de la descripción de la neoplasia en *M. chilensis* (Campalans et al., 1998) y en *T. chilensis* (Rojas et al., 1999), el trabajo de la descripción de las anomalías en ostra japonesa (González et al., 1999) y el trabajo sobre la parasitosis hemocítica en ostra chilena (Campalans et al., 2000).

Por otro lado, como se puede apreciar en Riquelme et al. (2000), los estudios de las bacterias en cultivo de larvas del ostión del norte han sido conducidos hacia la investigación de probióticos, para mejorar la supervivencia de esta etapa del desarrollo del ostión.

✱ **Enfermedades de importancia internacional:**

Las enfermedades de mayor relevancia por su carácter de transmisibles, y que tienen repercusiones en el comercio internacional, son señaladas por la OIE como de “Declaración Obligada” a esta organización. La OIE informa de la situación epidemiológica de estas enfermedades en cada uno de sus países miembros.

De acuerdo a su gravedad, las enfermedades han sido clasificadas en:

⇒ **Lista A:** (aplicables a enfermedades de mamíferos y aves)

Enfermedades transmisibles que presentan gran poder de difusión y especial gravedad, que pueden extenderse más allá de las fronteras nacionales, que tienen consecuencias socioeconómicas o sanitarias graves y cuya incidencia en el comercio internacional de animales y productos de origen animal es muy importante.

Esta Lista no incluye enfermedades de organismos acuáticos.

⇒ **Lista B:**

Enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables.

Las enfermedades que están incluidas en esta Lista, a su vez se clasifican en:

Enfermedades de Declaración Obligatoria: Considera las enfermedades más peligrosas, de etiología comprobada y limitado rango geográfico. (Cuadro N° 4)

Otras enfermedades importantes: Se refiere a enfermedades de menor trascendencia económica, limitada distribución geográfica o descubiertas demasiado recientemente para clasificarlas como de Declaración Obligatoria. (Cuadro N°5)

Cuadro N°4 : Enfermedades de declaración obligatoria a la OIE, por especie de cultivo

PECES	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necrosis hematopoyética epizoótica ▪ Necrosis hematopoyética infecciosa ▪ Herpesvirosis del salmón masou ▪ Viremia primaveral de la carpa ▪ Septicemia hemorrágica viral
MOLUSCOS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bonamiosis ▪ Haplosporidiosis ▪ Marteiliosis ▪ Microcitosis ▪ Perkinsosis
CRUSTACEOS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Síndrome de Taura ▪ Enfermedad de las manchas blancas ▪ Enfermedad de la cabeza amarilla

Cuadro N°5 : Otras enfermedades importantes, por especie de cultivo

PECES	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Virosis del bage de canal ▪ Encefalopatía y retinopatía virales ▪ Necrosis pancreática infecciosa ▪ Anemia Infecciosa del Salmón ▪ Síndrome ulcerante epizoótico ▪ Renibacteriosis ▪ Septicemia entérica del bage ▪ Piscirickettsiosis ▪ Girodactilosis ▪ Iridovirosis de la dorada japonesa
CRUSTACEOS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necrosis del páncreas por baculovirus ▪ Poliedrosis nuclear por baculovirus ▪ Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ▪ Síndrome de mortalidad al desove

Fuente: Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos (OIE), 1999

* **Categorización de enfermedades**

Un completo listado de enfermedades será de utilidad para los fines del proyecto, si éstas se clasifican o categorizan en función de su importancia, tanto internacional como para el país. Por lo general, el concepto de importancia de las enfermedades se relaciona con el impacto en la producción en cada país, siendo éste uno de los factores más relevantes que condicionan las políticas de manejo sanitario en países donde la acuicultura representa una actividad económica.

Una categorización internacional de enfermedades la proporciona la OIE, que en la 3ra. Edición de su Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos, año 2000, entrega un listado de enfermedades consideradas de declaración obligada. En el caso de organismos acuáticos, se trata de enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socio económico y/o de salud pública y que tienen repercusión en el comercio internacional de los recursos acuáticos o sus productos.

Aún cuando la OIE trata de representar en la mejor forma los intereses de todos sus países miembros, la categorización de enfermedades es un tema complejo debido a que las diferentes partes del mundo presentan condiciones ambientales particulares, lo que hace que los riesgos asociados sean también diferentes. Es por ello que una categorización debe considerar el hecho que enfermedades que no son importantes para una especie en una región dada, pueden llegar a ser importantes si son introducidas a una nueva especie huésped, o si el mismo huésped no se ha adaptado al organismo patógeno, (Elston, 1990), por lo cual debe ser lo suficientemente flexible a fin de permitir la modificación o adaptación de los criterios, en la medida que éstos definan mejor los riesgos en cada situación particular.

Además, es necesario tener en cuenta la importancia asignada internacionalmente a cada enfermedad, lo cual servirá para mejorar la confianza en los sistemas reguladores de países exportadores. Esta información ayudará también a los países compradores durante el análisis de riesgos.

Una buena categorización, también deberá permitir la actualización de los criterios acorde a las modificaciones de estos a nivel internacional, como la realizada por OIE que, en el código de 1995, considera aspectos socio económicos y zoonosológicos para asignar importancia a las enfermedades y, en la versión 2000 del mismo código, se reemplaza el aspecto zoonosológico por el

de salud pública. Al respecto, la Comisión de Enfermedades de Peces de la OIE (FDC) considera que estos criterios de categorización de las enfermedades, aún no son los más representativos para los organismos acuáticos, puesto que sus enfermedades tienen principalmente un impacto socioeconómico, a diferencia de lo que ocurre con los animales terrestres donde el aspecto más relevante es la salud pública.

Considerando lo anterior, la FDC está tratando de establecer criterios claros para decidir si una enfermedad en particular debiera ser incluida en el listado del Código Sanitario. Una situación similar está ocurriendo en la Comunidad Europea, para decidir qué enfermedades debieran ser incluidas en la nueva legislación de la EU (comunicación personal, Dr. Barry Hill). Para lograr un consenso entre los diferentes países, la OIE le ha hecho llegar un cuestionario a cada uno de sus países miembros. Para el caso de Chile, los criterios deberán estar tratados de tal manera que consideren las nuevas tendencias de las normativas internacionales.

En Chile, la primera clasificación de enfermedades se publica el 13 de Julio de 1985 en el Diario Oficial, Decreto Ministerial N°162, Reglamento sobre el control de las enfermedades de peces de la familia salmonidae y otras especies hidrobiológicas.

Dicha reglamentación define y clasifica las enfermedades en tres clases, de acuerdo a su peligrosidad. La clase I incluye las enfermedades más relevantes por su peligrosidad, (VHS, IPN, IHN, *Myxosoma cerebralis*, BKD); la clase II incluye las enfermedades que representan menor peligrosidad (OMV, ERM, *A. salmonicida*, Vibriosis: *V. anguillarum*, *V. ordalii*) y la clase III considera las enfermedades de baja peligrosidad (Columnaris (*Flexibacter columnaris*), Septicemia por *Aeromonas Motiles* (*A. hydrophila*), Septicemia por *Pseudomonas* (*Pseudomonas spp.*), Ictioftiriasis (*Ichthyophthirius multifiliis*), Costiasis (*Ichthyobodo necatrix*), Ceratomixosis de los salmonídeos (*Ceratomyxa shasta*)).

Este reglamento, junto con ser el primero dirigido a conocer y proteger las condiciones de salud de las especies en cultivo, entrega la clasificación de enfermedades que serían consideradas importantes para el país. No obstante lo anterior, este reglamento no fue el producto de una investigación sobre las enfermedades que estaban presentes en las poblaciones de cultivo o nativas del país, sino que la importancia fue asignada basándose en la información disponible de patógenos importantes en otras latitudes.

Posterior a este reglamento, el Título IV, párrafo II, Artículo 86 de la Ley N° 18.892 de 1989, señala la necesidad de reglamentar las medidas de protección y control para evitar la introducción de enfermedades de alto riesgo y especies que constituyen plagas, aislar su presencia en caso que esto ocurra, evitar su propagación y propender a su erradicación. El mismo reglamento debía determinar las patologías que se clasificarían como de alto riesgo y las especies hidrobiológicas que constituirían plagas.

En 1991, se decreta el texto refundido, coordinado y sistematizado de la Ley N°18.892 y sus modificaciones, como Ley General de Pesca y Acuicultura. En ella, se define enfermedades de alto riesgo como la desviación del estado completo de bienestar físico de un organismo, que involucra un conjunto bien definido de síntomas y etiología, que conduce a una grave limitante de sus funciones normales, asociada a altas mortalidades y de carácter transmisible a organismos de la misma u otras especies.

Los Decretos Supremos N°96 de 1996 y N°325 de 1999, regulan procedimientos, certificación y otros requisitos sanitarios para la importación de especies hidrobiológicas y la Resolución N°1930 de 1999, establece la nómina de especies hidrobiológicas vivas de importación autorizada; sin embargo, ninguno de estos documentos, publicados a partir de la Ley General de Pesca y Acuicultura, se refiere a una clasificación de las enfermedades que afectan a estas especies.

La categorización de enfermedades que se propone está basada en los criterios internacionales, especialmente en los de la OIE, en las reglamentaciones de países importadores y en la realidad chilena.

La historia de enfermedades en Chile se presenta en el Anexo I.

1.2. Desarrollo Metodológico y Resultados

Para dar cumplimiento a este objetivo específico, es necesario disponer de información fidedigna y actualizada sobre las enfermedades de organismos acuáticos, asociados al proyecto, que se cultivan hoy en Chile.

Para la obtención de dicha información, se diseñó la encuesta *Técnicas de Diagnóstico en Enfermedades de Salmónidos, Mitílidos, Pectínidos y Ostréidos*, (Anexo II), en dos versiones. Una de ellas (*Encuesta a Laboratorios Nacionales de Servicios*), se aplicó a la totalidad de los Laboratorios de Diagnóstico chilenos que prestan servicios a la empresa acuicultora, listados en el Cuadro N°6. La otra versión (*Encuesta a Laboratorios de Investigación*) se aplicó a los Laboratorios Nacionales de Investigación Científica y Tecnológica en el área, que se listan en el Cuadro N°7. Estos formularios, que fueron diseñados preferentemente en base a preguntas cerradas, también incluyeron preguntas respecto de variables e indicadores que ayudaron a dar cumplimiento a los Objetivos 4.2 y 4.3 del presente proyecto.

Para los Laboratorios de Servicio, se utilizó el método de envío por correspondencia al responsable del laboratorio, al cual se le informó previamente, vía correo electrónico y correo normal, de los objetivos de la encuesta. Las no respuestas en el plazo de un mes después del envío, se trataron mediante entrevista personal al encargado del laboratorio o a un profesional autorizado por éste.

De los 23 Laboratorios de Servicios a los cuales se les envió la encuesta, 15 la respondieron. El Laboratorio Ceram, la Piscicultura Experimental y Salmovet, no la contestaron debido a que ellos no realizan diagnóstico; el Laboratorio de Marine Harvest no fue autorizado a responderla y los laboratorios restantes no enviaron sus respuestas, pese a las continuas visitas y llamados solicitándolas.

Cuadro N°6 : Laboratorios de Diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos.

Nombre del Encargado	Nombre del Laboratorio	Dirección
Sr. Oliver Whener	Acevet (Biosalmo)	Puerto Montt, X Región
Sr. Patricio Bustos	ADL. Diagnostic Chile Ltda.	Castro, X Región
Sra. Soledad Rivera	Alítec	Puerto Montt , X Región
Sr. Oscar Gárate	Aquatic Health	Puerto Montt, X Región
Sr. Ricardo Ildefonso	Aquatic Health	Castro, X Región
Sr. Basilio Pérez	Aquatic Health	Coyhaique, XI Región
Srta. Carolina San Martín	Biovac S.A.	Puerto Aysén, X Región
Sr. Patricio Mansilla	Biovac S.A.	Puerto Cisne, X Región
Sr. Enrique Madrid	Biovac S.A.	Puerto Montt, X Región
Sra. Miriam Seguel	Ceram (U. De Chile)	Puerto Montt, X Región
Sra. Olga Ureta	Cesmec Ltda.	Macul, Santiago
Sra. Ana María Sandino	Gam S.A. (Diagnotec S.A.)	Santiago
Sr. Javier Moya	Diagnotec S.A.	Puerto Montt, X Región
Sr. Erwin Serón	Especialidades Técnicas Marinas	Castro, X Región
Sra. Beatriz Opazo	Fundación Chile	Puerto Montt, X Región
Sr. Ricardo Cortés	Fundación Chile	Puerto Chacabuco, XI Región
Sr. Julián Briones	Fundación Chile	Puerto Montt , X Región
Sr. Raúl Castro	IFOP	Coyhaique, XI Región
Srta. Jessica Montaña	Marine Harvest	Puerto Montt, X Región
Sr. Rodrigo Yáñez	Piscicultura Experimental	Castro, X Región
Sr. Víctor Alvarado	Salmovet	Puerto Montt, X Región
Sr. Ricardo Enríquez	Universidad Austral de Chile	Valdivia, X Región
Sr. Juan Kuznar	Universidad de Valparaíso	Valparaíso

En el caso de los Laboratorios de Investigación se utilizó el método de entrevista personal a los profesionales responsables. Con el fin de dar un mayor plazo a los entrevistados para la recopilación de la información solicitada, previamente se les envió una carta informativa acerca del proyecto y el formulario correspondiente. De los 20 Laboratorios a los que se les envió formulario, 11 lo respondieron.

Cuadro N°7: Laboratorios asociados a Investigación Científica y Tecnológica.

LABORATORIO	DIRECCIÓN
Laboratorio de Peces. Instituto de Biología Marina, Universidad de Valparaíso	- Av. Borgoño s/n. Reñaca, Viña del Mar
Facultad de Medicina Veterinaria Departamento de Patología Universidad de Concepción	- Av. Vicente Méndez 595, Chillán
Facultad de Ciencias del Mar Universidad Andrés Bello	- Manuel Montt 367, Providencia, Santiago
Ciencias del Mar. Universidad Arturo Prat	- Av. Matta 2065, Iquique
Instituto de Acuicultura Universidad de Magallanes	- Av. Bulnes 1855, Punta Arenas
Facultad de Veterinaria Universidad Mayor de Santiago	- Américo Vespucio Sur 357, Las Condes, Santiago
Departamento Acuicultura Universidad de Los Lagos	- Casilla 933, Osorno
Biotecmar Servicios Universidad Católica de la Santísima Concepción	- Casilla 297, Concepción
Facultad de Recursos del Mar Universidad de Antofagasta	- Av Angamos 601, Antofagasta
Departamento de Acuicultura Universidad Católica del Norte	- Casilla 117, Coquimbo
Instituto de Biología Marina. Laboratorio de Moluscos Universidad de Valparaíso	- Av. Borgoño s/n, Reñaca, Viña del Mar
Instituto de Biología Universidad Católica de Valparaíso	- Av. Brasil 2950, Valparaíso
Escuela de Ciencias del Mar Universidad Católica de Valparaíso	- Av. Altamirano 1480, Valparaíso
Facultad de Veterinaria. Laboratorio de Patología Universidad Austral de Chile	- Casilla 567 Valdivia
Facultad de Ciencias Veterinarias Laboratorio Biotecnología Universidad Austral de Chile	- Casilla 567 Valdivia
Departamento de Biología Marina Universidad Católica del Norte	- Casilla 117. Coquimbo
Medicina Veterinaria Universidad de Chile	- Av. Santa Rosa 11735, Santiago
Laboratorio de Bioquímica y Virología, Facultad de Ciencias. Universidad de Valparaíso	- Errázuriz 2120, Casilla 5030, Valparaíso
Plancton Andina Ltda. (PAL)	- Loteo Sta. Augusta, Parcela 5, Puerto Varas
Shering-Plough Animal Health	- O'Higgins 167, Puerto Montt

Los Laboratorios de Servicio de nuestro país, de acuerdo a su ubicación, se encuentran divididos en Laboratorio Central y Sucursales. El detalle de los Laboratorios de Diagnósticos consultados, según esta clasificación, se presenta en el Cuadro N°8.

Cuadro N°8: Laboratorios de Diagnóstico consultados, según ubicación

NOMBRE	UBICACION	
	Laboratorio Central	Sucursales
Aquatic Health	Puerto Montt	Castro Coyhaique
Biovac S.A.	Puerto Montt	Puerto Aysén Puerto Cisne
Diagnotec S.A.	Santiago	Puerto Montt
Fundación Chile	Puerto Montt	Puerto Chacabuco Castro
ADL. Diagnostic Chile Ltda..	Castro	No tiene
Alitec	Puerto Montt	No tiene
Especialidades Técnicas Marinas	Castro	No tiene
Instituto de Fomento Pesquero	Coyhaique	No tiene
Total	8	7

Algunos resultados de interés provenientes de las respuestas de los Laboratorios se muestran a continuación.

Cuadro N° 9: Laboratorios según Especialidad por Patógeno y Tipo de Laboratorio

ESPECIALIDAD	TIPO DE LABORATORIO	
	De Servicios	De Investigación
Virología	10	4
Bacteriología	15	7
Parasitología	14	6
Micología	5	3
No responde	0	2

El Cuadro N°10 muestra la cantidad de Laboratorios de Servicios que afirman haber diagnosticado, en forma confirmatoria, los agentes que se listan para las especies de Salmónidos indicados. Además de los agentes listados, dos de estos Laboratorios diagnosticaron en forma confirmatoria U2 en Salmón del Atlántico y Hongos Filamentosos en Salmón Coho, Salmón del Atlántico y Trucha Arcoiris. Por otra parte, un Laboratorio también diagnosticó confirmatoriamente *Flavobacterium johnsoniae* en Salmón del Atlántico; *Diphilobothrium* (plercocoides), *Aniclora montli* y U2 en Trucha Arcoiris y U2 en Salmón Coho.

Cuadro N°10: Laboratorios de Servicios con diagnóstico confirmatorio, para cada Agente y Especie de Salmónidos en cultivo.

AGENTE	ESPECIE DE SALMONIDOS EN CULTIVO			
	Salmón Coho	Salmón del Atlántico	Trucha Arcoiris	Salmón Chinook
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	15	15	14	4
<i>Piscirikettsia salmonis</i>	15	15	15	3
<i>Flavobacterium spp.</i>	8	8	8	2
<i>Flavobacterium columnare</i>	7	7	6	0
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	10	10	10	0
<i>Flexibacter maritimus</i>	2	2	1	0
<i>Flavobacterium aqualitis</i>	5	3	3	0
<i>Flavobacterium hutchinsonii</i>	1	2	1	0
<i>Yersinia ruckeri</i>	4	7	5	0
<i>Vibrio spp.</i>	3	5	4	0
<i>Aeromonas spp.</i>	3	4	3	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5	8	5	0
<i>Aeromonas salmonicida atípica</i>	2	4	0	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	4	6	4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5	2	0
<i>Streptococcus spp.</i>	0	4	2	0
<i>Streptococcus fecalis</i>	0	3	0	0
<i>Enterococcus sp.</i>	1	3	2	0
Necrosis pancreática infecciosa	10	10	10	3
Anemia infecciosa del salmón	2	0	0	0
Leucosis linfoblástica	0	2	0	0
<i>Ichthyobodo necatrix</i>	1	4	2	0
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	3	8	9	2
<i>Chilodonella spp.</i>	2	5	2	0
<i>Hexamita spp.</i>	4	5	7	0
<i>Microsporidium spp.</i>	3	5	3	0
<i>Nucleospora salmonis</i>	4	5	2	2
<i>Kudoa sp.</i>	1	5	1	0
<i>Caligus spp.</i>	9	10	9	2
<i>Ergasilus sp.</i>	0	4	2	0
<i>Ceratomyxa</i>	0	4	3	0
<i>Trichodina sp.</i>	2	5	5	0

Respecto de agentes que no se han diagnosticado confirmatoriamente en algunas especies, se debe mencionar que se declararon diagnósticos presuntos en *Aeromonas salmonicida* atípica en Trucha Arcoiris, Anemia Infecciosa del Salmón (ISA) en Salmón del Atlántico y Trucha Arcoiris y Leucosis Linfoblástica en Salmón Coho y Trucha Arcoiris.

Para complementar la información de enfermedades obtenida a través de las encuestas y con el fin de describirlas de la mejor forma posible, se realizó una recopilación bibliográfica, cuyos resultados se resumen en los Cuadros N°11 y N° 12.

Cuadro N°11: Enfermedades y Agentes Patógenos de Salmónidos, registrados en publicaciones científicas.

AGENTE	ENFERMEDAD
VIRUS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) ➤ Necrosis Hematopoiética Infecciosa (IHN) ➤ Necrosis Hematopoiética Epizootica (EHN) ➤ Enfermedad Viral del <i>Oncorhynchus masou</i> (OMV) ➤ Septicemia Hemorrágica Viral (VHS) ➤ Necrosis Nerviosa Viral (NNV) ➤ Necrosis Eritrocítica Viral (VEN) ➤ Anemia Infecciosa del Salmón (ISA) ➤ Herpesvirus salmonis ➤ Rhabdovirus salmonis ➤ Paramyxovirus del salmón chinook ➤ Virus tipo Picornavirus de los salmónidos ➤ Necrosis Dermática Ulcerativa (UDN) ➤ Enfermedad viral de la frutilla (Strawberry) de la trucha ➤ Reovirus del salmón chum ➤ Reovirus del salmón coho ➤ Reovirus del onchorynchus masou taiwanés ➤ Reovirus de la trucha arcoiris taiwanesa ➤ Sarcoma viral de la vejiga natatoria del salmón atlántico ➤ Enfermedad pancreática (PD) ➤ Síndrome Eritrocítico de cuerpos de Inclusión (EIBS) ➤ Virus intraeritrocítico de la trucha arcoiris ➤ Enfermedad viral intraeritrocítica del salmón coho ➤ Agente de la papilomatosis del salmón atlántico

<p>BACTERIAS</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedad Bacteriana del Riñón, <i>Renibacterium salmoninarum</i> (BKD) ➤ Piscirickettsiosis <i>Piscirickettsia salmonis</i> (SRS) ➤ Yersiniosis, <i>Yersinia ruckeri</i> (ERM) ➤ Flavobacteriosis, <i>Flavobacter psychrophilus</i> (RTFS), <i>F. columnare</i>, <i>F. Aqualitis</i>, <i>F. hutchinsoni</i>, <i>F. branchiophila</i>, <i>F. spp.</i> ➤ Furunculosis, <i>Aeromonas salmonicida</i> ➤ Vibriosis de Agua Fría, <i>Vibrio salmonicida</i> ➤ Vibriosis clásica, <i>Vibrio anguillarum</i>, <i>V. ordalii</i> ➤ Septicemia por aeromonas móviles (MAS), <i>Aeromonas hydrophila</i> ➤ Aletas rotas (<i>Cytophaga aqualitus</i>, <i>C. succinicans</i>, <i>C. jhonsoanae</i>, <i>C. rosea</i>) ➤ Enterobacteriosis (<i>Citrobacter freundii</i>, <i>Serratia liquefaciens</i>, <i>Serratia plymuthica</i>) ➤ Septicemia hemorrágica <i>Pseudomonas spp.</i> ➤ Pasteurelisis, <i>Pasteurella piscicida</i> ➤ Epiteliocistis, <i>Clamidyia indefinida</i> ➤ Columnaris de agua salada, <i>Sporocytophaga sp.</i> ➤ Meningitis eubacterial, <i>Eubacterium tarantellus</i> ➤ Edwarseliosis (<i>Edwarsiella tarda</i>, <i>E. ictaluri</i>). ➤ Nocardiosis, <i>Nocardia seriolae</i> ➤ <i>Carnobacterium (Lactobacillus) piscicola</i> ➤ Acitenobacteriosis, <i>Acitenobacter sp.</i> ➤ <i>Vagococcus salmoninarum</i> ➤ <i>Lactococcus piscium</i> ➤ <i>Streptoverticillium salmonis</i> ➤ Botulismo, <i>Clostridium botulinum</i> ➤ Micobacteriosis (<i>Mycobacterium marinum</i>, <i>M. fortuitum</i>, <i>M. chelonae</i>)
<p>PROTOZOOS</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedades por parásitos ciliados externos (<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>, <i>Trichodina sp.</i>, <i>Chilodonella cyprini</i>, <i>Tetrahymena sp.</i>, <i>Chilodonella sp.</i>, etc.) ➤ Ichthyobodiosis, (<i>Ichthyobodo necatrix</i>, <i>I. pyriformis</i>) ➤ Hexamitiasis, (<i>Hexamita sp.</i>) ➤ <i>Nucleospora salmonis</i> ➤ Licuefacción del músculo, <i>Kudoa sp.</i> ➤ <i>Amiloodinium ocellatum</i> ➤ <i>Trypanosoma sp.</i> ➤ <i>Trypanoplasma (Cryptobia) sp.</i> ➤ Pleistophoriosis ➤ Ceratomyxosis, <i>Ceratomyxa shasta</i> ➤ Enfermedad del torneo, <i>Myxobolus cerebralis</i> ➤ Mixosporidiosis del músculo, <i>Myxobolus insidiosus</i> ➤ Mixosporidiosis del riñón, <i>Parvicapsula sp.</i> ➤ Mixosporidiosis de escamas (<i>Myxobolus squamalis</i>, <i>M. minteri</i>) ➤ <i>Henneguya salminicola</i> ➤ Enfermedad proliferativa del riñón (PKD) ➤ Enfermedad proliferativa de la branquia (PGD) ➤ Microsporidiosis branquial, <i>Loma (Pleistophora) salmonis</i> ➤ Microsporidiosis intestinal, <i>Glugea stephani</i> ➤ Microsporidiosis de las células hematopoiéticas, <i>Enterocytozoon salmonis</i> ➤ Microsporidiosis ovárica, <i>Pleistophora ovariae</i>

PARASITOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedades causadas por tremátodos monogenésicos (<i>Gyrodactylus salaris</i>, <i>G. Spp.</i>, <i>Dactylogyru</i>s spp.) ➤ Ergasilosis ➤ <i>Argulus spp.</i> ➤ Piojos marinos (<i>Caligus elongates</i>, <i>C. spp.</i>, <i>Lepeophtheirus spp.</i>) ➤ <i>Ceratothoa spp.</i> ➤ <i>Pseudodactylogyru</i>s spp. ➤ Elmintiosis, <i>Hepatoxylon trichiuri</i> ➤ <i>Lernaea sp.</i> ➤ Enfermedad del gusano de la branquia, <i>Salmincola sp.</i>
HONGOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Saprolegniosis (<i>Saprolegnia parasitica</i>, <i>S. diclina</i>, <i>S.ferax</i>, <i>S.sp.</i>, <i>Achlya sp.</i>) ➤ Enfermedad del balanceo, <i>Ichthyophonu</i>s hoferi ➤ Hongo de la vejiga natatoria, <i>Phoma herbarum</i> ➤ Hongo de las branquias, <i>Branquiomyc</i>es sanguinis, <i>B. demigrans</i>) ➤ Enfermedad granulomatosa, <i>Exophiala salmonis</i>
ORIGEN INCIERTO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Anemia Marina/Leucosis Plasmacitoidea/Leucosis Linfoblástica/Leucemia Linfoblástica (Virus de la Leucemia del salmón, <i>Nucleospora salmonis</i>) ➤ Roseta del salmón chinook ➤ Síndrome de la mortalidad nerviosa ➤ Síndrome de la hemorragia del riñón

Cuadro N°12: Enfermedades y Agentes Patógenos de Moluscos, registrados en publicaciones científicas, por especie

<i>OSTRAS</i>	
AGENTE	ENFERMEDAD
VIRUS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedad Viral del Velo de la Ostra (OVVD) ➤ Enfermedad de la Branquia de la Ostra Portuguesa ➤ Enfermedad de la Infección Hemocítica Viral de la Ostra ➤ Enfermedad del Virus Tipo-Herpes de la Ostra ➤ Hipertrofia Gametocítica Viral de las ostras ➤ Infección viral tipo-Papova de las ostras perlíferas
BACTERIAS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ “<i>Rickettsiae</i>” Gigante Extracelular de las Ostras ➤ Nocardiosis de las ostras ➤ Enfermedad del ligamento de moluscos bivalvos juveniles ➤ Organismos tipo-<i>Rickettsia</i> y tipo-<i>Chlamydia</i> de las ostras ➤ <i>Vibrio spp.</i> (Vibriosis Larval y Juvenil) de las ostras ➤ Enfermedad del ligamento de la bisagra de las ostras juveniles ➤ Infección bacteriana crónica
HONGOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Ostracoblabe implexa</i> (Enfermedad de la Valva) de las ostras ➤ <i>Sirolopidium zoophthorum</i> (Micosis Larval) de las ostras
PROTOZOOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Bonamia ostreae</i> de las ostras ➤ <i>Bonamia sp.</i> (Bonamiasis de las ostras de Nueva Zelandia) ➤ <i>Perkinsus marinus</i> (Enfermedad “Dermo”) de las Ostras ➤ <i>Perkinsus olseni</i> ➤ <i>Perkinsus spp.</i> ➤ Coccidiosis Renal de las Ostras ➤ <i>Haplosporidium nelsoni</i> (MSX) de las ostras ➤ <i>Haplosporidium costale</i> (SSO) de las ostras ➤ <i>Minchinia armoricana</i> de las ostras ➤ Marteiliosis (Enfermedad de Aber) de las ostras ➤ <i>Marteilioides chungmuensis</i> de las ostras ➤ <i>Marteilioides branchialis</i> de las ostras ➤ <i>Marteilia sydneyi</i> (QX) de las ostras ➤ <i>Marteilia lengehi</i> ➤ <i>Marteilia christenseni</i> ➤ <i>Marteilia spp.</i> ➤ <i>Mikrocytos mackini</i> (Enfermedad de las Islas Denman) de las ostras ➤ <i>Mikrocytos roughleyi</i> (Enfermedad del Invierno Australiano) de las ostras ➤ Microsporidiosis de las ostras del dragado ➤ Hexamitiasis de las ostras (<i>Hexamita nelsoni</i>, <i>Hexamita sp.</i>) ➤ Ciliados tipo-<i>Ancistrocoma</i> de las ostras ➤ Ciliados tipo-<i>Sphenophrya</i> de las ostras ➤ Trichodinidos de las branquias de las ostras

PARASITOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Myticola intestinalis</i> (Enfermedad del Gusano Rojo 1) de las ostras ➤ <i>Mytilicola orientalis</i> (Enfermedad del Gusano Rojo 2) de las ostras ➤ Enfermedad del Trematodo de las ostras ➤ Copépodos Parasíticos de las branquias de las ostras ➤ Cangrejo enano en las ostras ➤ Poliquetos perforadores de la valva de las ostras ➤ Esponjas escavadoras de la valva de las ostras ➤ Caracoles Piramidales de las ostras ➤ Turbellaria de la branquia de la ostra
ORIGEN INCIERTO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedad del huevo de las ostras ➤ Neoplasia Hemocítica de las ostras (HCN) ➤ Enfermedad juvenil de la Ostra del Este ➤ Enfermedad Malpeque de las ostras ➤ Lesión del tracto digestivo de la larva de las ostras ➤ Parasitismo gregario de las ostras

<i>MITILIDOS</i>	
AGENTE	ENFERMEDAD
VIRUS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedad tipo-viral de los mitílidos
BACTERIAS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Organismos tipo-<i>Rickettsia</i> y tipo-<i>Chlamydia</i> de los mitílidos
PROTOZOOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Steinhausia mytilovum</i> (Enfermedad del huevo del mitílido) ➤ <i>Marteilia refringens/maurini</i> de los mitílidos ➤ Coccidiosis Renal de los mitílidos ➤ Ciliados Intracelulares de los mitílidos ➤ Ciliados tipo-<i>Sphenophrya</i> de los mitílidos ➤ Ciliado branquial <i>Ancistrum mytili</i> de los mitílidos
PARASITOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Invasión de la valva de alga verde-azulada de los mitílidos ➤ Enfermedad del Tremátodo del mitílido ➤ Turbellaria de la branquia del mitílido ➤ <i>Mytilicola intestinalis</i> (Enfermedad del Gusano Rojo) de los mitílidos ➤ <i>Mytilicola orientalis</i> (Gusano Rojo) de los mitílidos ➤ <i>Mytilicola porrecta</i> (Gusano Rojo) de los mitílidos ➤ Cangrejo enano en los mitílidos ➤ Poliquetos perforadores de la valva de los mitílidos ➤ Esponjas escavadoras de la valva de los mitílidos
ORIGEN INCIERTO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Neoplasia Hemocítica de los mitílidos ➤ Parasitismo Gregario de los mitílidos

PECTINIDOS	
AGENTE	ENFERMEDAD
BACTERIAS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Enfermedad Bacteriana Intracelular de Pectínidos ➤ Lesiones de Abscesos Bacterianos de Pectínidos ➤ Organismos tipo-<i>Rickettsia</i> y tipo-<i>Chlamydia</i> de Pectínidos ➤ <i>Vibrio spp.</i>(Vibriosis Larval) de Pectínidos ➤ Enfermedad del ligamento de moluscos bivalvos juveniles ➤ Clamidiosis de Pectínidos
PROTOZOOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Perkinsus sp.</i>de Pectínidos Japoneses en Asia ➤ Haplosporidiosis de Pectínidos ➤ <i>Marteilia sp.</i> de Pectínidos ➤ <i>Perkinsus augwadi</i> (SPX) de Pectínidos ➤ Coccidiosis Renal de Pectínidos ➤ <i>Perkinsus karlsoni</i> de Pectínidos ➤ Tricodinitis de la Branquia de Pectínidos
PARASITOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Copépodo (“bolsa de cría”) de la branquia de Pectínidos ➤ Cangrejo enano en Pectínidos ➤ Turbellaria de la Branquia de Pectínidos ➤ Poliquetos perforadores de la valva de Pectínidos ➤ Esponjas escavadoras de la valva de Pectínidos ➤ Parásito de la branquia del ostión (pecten) japonés
ORIGEN INCIERTO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Parasitismo Gregario de Pectínidos ➤ Protista G de Pectínidos

Criterios propuestos para una Categorización

Idealmente, una categorización de enfermedades debería realizarse conociendo la totalidad de las enfermedades que constituyen plagas, tanto en especies de cultivo como en especies nativas. Teniendo en cuenta que esta tarea es difícil de llevar a cabo, este estudio se limita sólo a las enfermedades que afectan a las especies de cultivo consideradas en este proyecto.

Considerando las características ambientales presentes en el Hemisferio Sur, los criterios empleados por Australia y Nueva Zelandia son los que más se aproximan a la realidad chilena. La razón se basa principalmente en que en ambos casos, los salmones corresponden a especies exóticas, introducidas desde el Hemisferio Norte, por lo tanto, los patógenos presentes en estas especies en el Hemisferio Sur, corresponden a patógenos introducidos desde el Hemisferio Norte, o a patógenos endémicos de amplia distribución geográfica en los cuerpos de agua y/o a patógenos presentes en los peces silvestres. Por esta razón, además de las enfermedades listadas por la OIE, como de declaración obligatoria, sería ideal incluir en la *Categoría I* del listado chileno, a las enfermedades capaces de causar severo daño económico, no presentes en el país, y que, aún cuando puedan tener control preventivo a través de vacunas, la aplicación de éstas implica un mayor costo económico y un efecto sobre los peces silvestres libres de estas enfermedades. Esto no es posible de hacer en esta ocasión, porque no se ha implementado un sistema nacional de vigilancia y no existe un conocimiento histórico de tales enfermedades, tanto en salmónidos como en la ictiofauna nativa.

Para la elaboración de una propuesta de categorización de enfermedades en Chile, se revisaron clasificaciones de enfermedades empleadas por Noruega, USA, Canadá, Reino Unido, Nueva Zelandia, Australia y los criterios publicados por la OIE para enfermedades de declaración obligada y peligrosas.

Como resultado de dicha revisión y con el respaldo de las conclusiones generadas en la discusión sobre este tema en el Seminario Taller realizado en el marco del presente proyecto, se optó por realizar una proposición de categorización basada sólo en los criterios OIE, debido a que la inclusión de cualquier otro criterio requeriría disponer de una completa información histórica y de la implementación de un sistema nacional de vigilancia de enfermedades de organismos acuáticos con un laboratorio nacional de referencia para este fin.

De acuerdo a lo anterior, la categorización propuesta para Chile, tanto para salmónidos como para mitílidos, pectínidos y ostréidos, contempla los siguientes criterios OIE:

- Impacto económico
- Repercusión en el comercio internacional
- Presencia o ausencia del agente infeccioso en el país
- Conocimiento etiológico de agentes nuevos (escaso o suficiente)

Debido a que las categorías a proponer se definen por la interacción de dos o más de estos criterios, en sus diferentes niveles de manifestación, y que estos criterios de categorización no tienen la misma importancia para salmónidos que para moluscos, esta propuesta de categorización se presenta separadamente para cada grupo de especies. Por otra parte, aun cuando, para el caso de los moluscos, se considera que se debe privilegiar el criterio de presencia o ausencia del organismo huésped en el país, criterio nuevo que no está considerado en los criterios OIE, éste no será incluido en esta propuesta de categorización.

Para efectos del presente proyecto se ha optado por simplificar el esquema de categorización incluyendo sólo las enfermedades más importantes para los cultivos. Por lo tanto, los criterios utilizados en estas categorizaciones privilegiarán la importancia económica de las enfermedades presentes en el país.

Los listados que se presentan con las enfermedades que integrarían las diferentes categorías (Cuadros N°13 y N°14), están basados en la información recopilada desde las diferentes publicaciones consultadas y en las respuestas a las encuestas realizadas a los Laboratorios Nacionales de Servicio Ictiopatólogico y/o de Investigación listados en los cuadros N°6 y N°7.

Propuesta de Categorización de Enfermedades de Salmónidos

Categoría I:

- Enfermedades infecciosas, de etiología comprobada y limitado rango geográfico.
- Enfermedades con serio impacto en la producción y repercusión en el comercio internacional de salmónidos.

Categoría II

- Enfermedades presentes en el país, de severo efecto económico y para las cuales aún no existen métodos de control y/o prevención efectivos.

Categoría III

- Enfermedades descritas en el país, de menor trascendencia económica, amplia distribución geográfica y para las cuales existe control a través de fármacos.

Cuadro N°13: Enfermedades de Salmónidos por Tipo de Patógeno, para cada Categoría.

	CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III
VIRALES	Septicemia hemorrágica viral (VHS)	Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)	
	Necrosis hematopoyética infecciosa (IHN)	Anemia Infecciosa del Salmón (ISA)	
	Necrosis hematopoyética epizoótica (EHN)		
	Enfermedad Viral del <i>Oncorhynchus masou</i> (OMV)		
	Retinopatía y Encefalopatía Viral		

BACTERIANAS	Furunculosis, <i>Aeromonas salmonicida</i>	Enfermedad Bacteriana del Riñón, <i>Renibacterium salmoninarum</i>	<i>Flexibacter columnaris</i> (Columnaris)
		Piscirickettsiosis, <i>Piscirickettsia salmonis</i> (SRS)	<i>F. columnare</i> , <i>F. aqualitis</i> , <i>F. hutchinsoni</i> , <i>F. branchiophila</i> ,
		Furunculosis atípica (<i>Aeromonas salmonicida</i> atípica)	Yersiniosis, <i>Yersinia ruckeri</i> (ERM)
			Flavobacteriosis, <i>Flavobacter psychrophilus</i> (RTFS) Pasteurelosis, <i>Pasteurella piscicida</i>
PARASITOS PROTOZOARIOS		<i>Nucleospora salmonis</i>	<i>Caligus spp.</i>
			Enfermedades por parásitos ciliados externos (<i>Trichodina sp.</i>)
			Ichthyobodiosis, (<i>Ichthyobodo necatrix</i> , <i>I. Pyrifirmis</i>)
			Hexamitiasis, (<i>Hexamita sp.</i>)
			Enfermedades por tremátodos monogénicos (<i>Gyrodactylus</i>)
			Ergasilosis
			<i>Argulus spp.</i>
			<i>Kudoa thyrsites</i>
			<i>Lepeophtheirus spp.</i>
			<i>Ceratothoa spp.</i>
HONGOS			<i>Pseudodactylogyrus spp.</i>
			Helmintiosis, <i>Hepatoxylon trichiuri</i>
ORIGEN INCIERTO		Leucosis Plasmacitoidea	<i>Lernaea sp.</i>
			<i>Saprolegnia spp.</i>
			Enfermedad granulomatosa (<i>Exophiala salmonis</i>)

Propuesta de Categorización para Enfermedades de Moluscos

Categoría I

- Enfermedades infecciosas, de etiología comprobada y limitado rango geográfico.
- Enfermedades con serio impacto en la producción y repercusión en el comercio internacional de moluscos.

Categoría II

- Enfermedades presentes en el país, de severo efecto económico y para las cuales aún no existen métodos de control y/o prevención efectivos.

Categoría III

- Enfermedades de menor trascendencia económica, de amplia distribución, cuya aparición en las especies huéspedes está relacionada con las prácticas de manejo y no causan patologías importantes.

Cuadro N°14: Listado de Enfermedades de Moluscos por Grupo de Especie huésped, para cada Categoría

CATEGORÍA I

<i>OSTRAS</i>	<i>Bonamia ostreae</i> de las ostras <i>Perkinsus marinus</i> (Enfermedad “Dermo”) de las Ostras <i>Haplosporidium nelsoni</i> (MSX) de las ostras Marteiliosis (Enfermedad de Aber) de las ostras <i>Microcytos mackini</i> (Enfermedad de las Islas Denman) de las ostras
----------------------	---

CATEGORÍA II

<i>OSTRAS</i>	<i>Bonamia sp.</i> Infeccion bacterial crónica
<i>PECTINIDOS</i>	Poliquetos perforadores de la valva de Pectínidos <i>Vibrio spp.</i> (Vibriosis Larval) de Pectínidos

CATEGORÍA III

<i>OSTRAS</i>	<p>Poliquetos perforadores de la valva de las ostras</p> <p>Copépodos parasíticos de las ostras</p> <p>Neoplasia Hemocítica de las ostras HCN</p> <p>Hexamitiasis de las ostras (<i>Hexamita nelsoni</i>, <i>Hexamita sp.</i>)</p> <p>Ciliados tipo Ancistrocoma de las ostras</p> <p>Trichodinidos de las branquias de las ostras</p>
<i>MITILIDOS</i>	<p>Neoplasia Hemocítica de los Mitílidos</p> <p>Poliquetos perforadores de las valvas de los Mitílidos</p> <p>Ciliados intracelulares de los Mitílidos</p> <p>Ciliados tipo-<i>Sphyrnophyra</i> de los Mitílidos</p>

Objetivo 4.2 :

Analizar información científica y procedimientos técnicos, nacional e internacional, en relación al diagnóstico de las enfermedades de recursos hidrobiológicos en cultivo

2.1 Antecedentes:

Diversas técnicas son aplicables a los agentes patógenos de los animales acuáticos. A efectos de examen y diagnóstico, el Manual de Diagnóstico para Enfermedades de Animales Acuáticos (Manual OIE, 1997) ha establecido 3 tipos de procedimientos que son aceptados para esa tarea:

- Examen clínico
- Diagnóstico presuntivo
- Identificación confirmatoria del agente patógeno

2.1.1. Examen clínico.

Los manuales de procedimientos para diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de organismos acuáticos, contienen las indicaciones básicas para el diagnóstico de las enfermedades consideradas de notificación y certificación. Estas se inician con indicaciones para la toma de la muestra en peces y moluscos clínicamente infectados (sintomáticos) y peces y moluscos aparentemente sanos (asintomáticos).

Para los primeros, se establece una muestra de no más de 10 individuos que manifiesten signos clínicos, o moribundos, los que deben ser capturados vivos y, de acuerdo a las especificaciones dadas, trasladados al laboratorio de análisis.

En el caso de las poblaciones asintomáticas, se debe abarcar un número estadísticamente representativo de individuos, el cual depende de las distintas prevalencias que se asuman para la enfermedad.

Los procedimientos de examen clínico, una vez obtenida la muestra, comienzan con el examen externo para detectar anomalías o deformidades, finalizando con el examen interno o procedimiento de necropsia que se debe realizar en un ambiente estéril.

2.1.2. Diagnóstico presuntivo.

*** *Procedimientos para detección de Virus:***

Para el caso de los moluscos no existe aún líneas celulares establecidas que puedan ser utilizadas para cultivo de los virus. En el caso de peces, se comienza con el procesamiento de las muestras y la inoculación de éstas en líneas celulares apropiadas.

▪ *Cultivos celulares:*

Previo a inocular muestras sospechosas en líneas celulares, se debe realizar una preparación de la muestra que consiste en:

- Homogeneizar los tejidos para liberar las partículas de virus, luego centrifugar y eliminar el debris celular.
- Eliminar bacterias y hongos en la muestra incubando el sobrenadante con antibióticos y antimicóticos o bien por filtración.

Después de inocular las muestras en los cultivos celulares adecuados, se incuban en las condiciones apropiadas, generalmente a 20 ó 22°C. Estos cultivos se observan durante 14 días para búsqueda de efecto citopático, el cual indica la replicación viral y, dependiendo de sus características, puede servir de evidencia presunta de la etiología del agente viral.

*** *Procedimiento para detección de bacterias:***

▪ *Cultivos:*

La muestra aséptica debe realizarse utilizando un asa bacteriológica o algodón (tip) que se coloca en estrías en uno o más medios de crecimiento, luego se incuba entre 20 a 25°C verificando las recomendaciones de incubación en caso de patógenos que requieran otra condición para su crecimiento.

Para esto existen medios enriquecidos no selectivos (crece una amplia variedad de bacterias) o bien medios selectivos que promueven el crecimiento de determinadas

bacterias e inhiben el crecimiento de otras. También se debe verificar si son bacterias de ambiente marino o de agua dulce para adicionar sal a los medios requeridos.

▪ Identificación de bacterias:

Se realiza a través de sus características bioquímicas que se encuentran detalladas en los manuales de taxonomía de bacterias, como por ejemplo *el Manual de Bergey de bacteriología sistemática* (Staley et al., 1989), y en publicaciones científicas del tema.

La identificación de la bacteria por sus características bioquímicas constituye una evidencia presunta del agente bacteriano implicado en una enfermedad.

▪ Histología:

Los tejidos seleccionados para esta técnica deben ser fijados inmediatamente en fijadores y tinciones apropiados. Posteriormente, son analizados microscópicamente.

✱ ***Procedimiento para la detección de protozoos***

▪ Obtención de las muestras:

Los organismos infectados deben ser examinados inmediatamente después de su captura. Deben llegar vivos al laboratorio en el agua de su medio original, porque los parásitos se pierden fácilmente por exceso de manipulación, agua clorada o grandes cambios de temperatura.

Específicamente, para parásitos de sangre se colecta una muestra de sangre en un tubo heparinizado desde el corazón. Los parásitos externos se examinan microscópicamente en frotis de mucus, raspado desde la piel y branquias.

Para examinar los órganos internos y la musculatura, se hace una incisión ventral, se examina, macroscópica y microscópicamente, presionando un pequeño pedazo de tejido en un portaobjetos y se cubre.

Generalmente, se toman simultáneamente muestras de tejidos para examen histológico, que, para el caso de moluscos, constituyen la base del diagnóstico presunto de protozoos parásitos.

* ***Procedimiento para la detección de hongos***

▪ ***Aislación e Identificación:***

La mayoría de los hongos se cultivan usando métodos similares a los de bacterias. El crecimiento es típicamente aeróbico, pero más lento que el bacteriano. Los medios de crecimiento de hongos se modifican para inhibir el crecimiento de bacterias, como por ejemplo antibióticos y alta concentración de azúcar. Habitualmente se usa agar sabourand.

Los hongos se clasifican basándose en su modo de reproducción, formación de micelio y la estructura y formación de células.

2.1.3. Identificación confirmatoria del agente patógeno.

Fundamentalmente, la identificación se realiza mediante procedimientos serológicos, que están basados en la reacción entre el antígeno y el anticuerpo específico. Para evidenciar esta reacción existen numerosas técnicas, por ejemplo, aglutinación, IFAT, Neutralización, ELISA y sus modificaciones.

En el caso específico de moluscos, las técnicas serológicas deben ser directas (detección de antígenos). Para esto, el principal impedimento está en la disponibilidad del antígeno para inmunización, la que depende de la aislación y proliferación del patógeno. En los moluscos, la mayoría de los patógenos son protozoos intracelulares, Rickettsias y virus (Mialhe et al., 1992).

Existen en la literatura algunos protocolos para la preparación de anticuerpos específicos para Baculovirus, *Bonamia ostreae* y organismos tipo Rickettsiales, pese a ello, aún no existe disponibilidad comercial de los anticuerpos.

Los métodos de diagnóstico aceptados por la OIE, que se presentan en los Cuadros N°15 y 16, corresponden a los métodos de uso mundial registrados en publicaciones especializadas de la materia.

Cuadro N°15: Técnicas de Diagnóstico aceptadas por la OIE para Enfermedades de Declaración Obligatoria en organismos acuáticos

<u>ENFERMEDADES DE PECES</u>	<u>TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO</u>
Necrosis hematopoyética epizoótica	Línea celular (BF-2 o FHM) Neutralización, ELISA, IFAT y PCR
Necrosis hematopoyética infecciosa	Línea celular (EPC o BF-2) Neutralización, ELISA, IFAT
Herpesvirosis del salmón <i>masou</i>	Línea celular CHSE-214 o RTG-2 Neutralización, ELISA, IFAT
Viremia primaveral de la carpa	Línea celular (EPC o FHM) Neutralización, ELISA, IFAT
Septicemia hemorrágica viral	Línea celular (BF-2 o EPC o RTG-2) Neutralización, ELISA, IFAT

<u>ENFERMEDADES DE MOLUSCOS</u>	<u>TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO</u>
Bonamiosis	Impresiones de tejido en porta objetos teñidos con kit comercial para células sanguíneas Histología, observación de morfología típica del patógeno
Haplosporidiosis	Examen citológico de glándula digestiva, branquias y manto en porta objeto teñidas con kit comercial para células sanguíneas, observar morfología descrita Examen histológico de glándula digestiva, observación diferentes etapas del parásito
Marteiliosis	Examen citológico de glándula digestiva en porta objeto teñidas con kit comercial para células sanguíneas, observación de morfología típica del parásito Examen histológico de tejido digestivo, observación de morfología del parásito
Microcitosis	Examen citológico de tejido con absceso o úlcera teñidos con kit comercial para células sanguíneas, observar parásito en células sanguíneas o libres Examen histológico a tejido de zonas que contienen pústulas, abscesos o úlceras, observación del parásito en los hemocitos y alrededor de los abscesos
Perkinsosis	Examen histológico de la masa visceral, observación de los trofozoitos típicos descritos Cultivo en medio de tioglicolato, observación después de la incubación y preparación con lugol, de morfología descrita del parásito

Cuadro N°16: Técnicas de Diagnóstico aceptadas por la OIE para Otras Enfermedades Importantes de organismos acuáticos

<u>ENFERMEDADES DE PECES</u>	<u>TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO</u>
Virosis del bagre de canal	Cultivo en células neutralización, ELISA, IFAT
Encefalopatía y retinopatía virales	Histopatología ELISA, IFAT, MET, PCR
Necrosis pancreática infecciosa	Cultivo en células (BF-2 o CHSE-214) Neutralización, ELISA, IFAT
Anemia infecciosa del salmón	Descubrimientos macroscópicos, histológicos y también hematológicos típicos. Cultivo en células (SHK-1) y Test IFAT
Síndrome ulcerante epizoótico	Histopatología
Renibacteriosis	Cultivo en KDM-2 , KDMC o SKDM), características bioquímicas Métodos serológicos (aglutinación, IFAT, ELISA) Métodos moleculares (PCR)
Septicemia entérica del bagre	Pruebas bioquímicas Métodos serológicos (ELISA, IFAT, Aglutinación)
Piscirickettsiosis	Cultivo en células (CHSE-214 o CHH-1 o RTG-2 o EPC o FHM sin antibióticos) Métodos serológicos a cultivos desde células FAT Tinción de Acridina Orange o Giemsa, a frotis de tejidos Método Molecular (PCR)
Girodactilosis	Morfología y morfometría de los ganchos marginales y de fijación. Métodos moleculares (PCR)

<u>ENFERMEDADES DE MOLUSCOS</u>	<u>TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO</u>
En el Manual de OIE no se describen otras enfermedades importantes para moluscos	

2.2 *Desarrollo Metodológico*

Parte de la información con la cual se trabajó para el cumplimiento de este objetivo, proviene de las encuestas especificadas en el objetivo 4.1 y que se incluyen en el Anexo 2. Por esta razón, en dichos instrumentos se consultó acerca de variables que permitieran:

- ◆ Dimensionar la experiencia, capacidades y campo de acción de los laboratorios nacionales que realizan diagnóstico y/o investigan acerca de enfermedades infectocontagiosas de salmónidos, mitílidos, pectínidos y ostréidos
- ◆ Conocer los procedimientos técnicos utilizados por los laboratorios mencionados.

Las tablas y gráficos que se presentan a continuación, resumen la información proporcionada por los laboratorios, respecto a su experiencia, capacidades, campo de acción y procedimientos técnicos que utilizan.

La totalidad de los Laboratorios de Servicios que respondieron, indicaron experiencia sólo en el diagnóstico de enfermedades de Salmónidos. A diferencia de ellos, los Laboratorios de Investigación, declararon experiencia tanto en el diagnóstico de Salmónidos como en el de Moluscos. La distribución de estos laboratorios, según los años que llevan realizando diagnóstico de enfermedades en Salmónidos y/o Moluscos, se presenta en el Cuadro N°17, para los de Servicios, y en el Cuadro N°18, para los de Investigación.

Cuadro N° 17: Laboratorios de Servicios, según Años de Experiencia en el diagnóstico de enfermedades de Salmónidos

AÑOS DE EXPERIENCIA	Nº de Laboratorios
Menos de 1 año	1
De 1 a 4 años	7
De 5 a 10 años	0
De 11 a 15 años	7
Total	15

Es destacable el hecho que un alto porcentaje (47%) de los Laboratorios de Servicio en diagnóstico de peces, posee entre 11 y 15 años de experiencia en esta actividad.

Por otra parte, los 15 Laboratorios de Servicios que respondieron la encuesta, declararon examinar Salmónidos en etapas de desarrollo correspondiente a Alevín o superior y 10 de ellos manifestaron que, además, trabajan con Ovas.

Cuadro N°18: Laboratorios de Investigación, según Años de Experiencia en el diagnóstico de enfermedades, por Tipo de Organismo

AÑOS DE EXPERIENCIA	Salmónidos	Moluscos
Menos de 1 año	0	0
De 1 a 4 años	3	4
De 5 a 10 años	1	2
De 11 a 15 años	3	2
Ignorado	4	3
Total	11	11

De acuerdo con el desarrollo de la acuicultura en Chile, los laboratorios se han ido multiplicando y creciendo en la medida que lo ha hecho la industria salmonera. Es así que, en la actualidad, de los quince Laboratorios de Diagnóstico para peces, los más importantes (Aquatic Health, Biovac S.A., Fundación Chile y ADL) en términos de la fracción de la industria a la que prestan sus servicios, por lo general, poseen sucursales, como se aprecia en el Cuadro N°19. En y relación al personal profesional o técnico que laboran en ellos, dicho cuadro permite observar que esos laboratorios son los que cuentan con una mayor cantidad (entre 11 y 13).

Los Cuadros N° 20 al N° 23 resumen información sobre laboratorios de servicio, clasificados según las técnicas de diagnóstico para peces y moluscos (confirmatorias y presuntas). Los cuadros N° 24 y N°25 presentan la información de las técnicas empleadas por los laboratorios de investigación para salmónidos y moluscos, según el tipo de patógeno.

Cuadro N°19: Número de Profesionales y Técnicos, por laboratorio en que trabajan

LABORATORIO	CLASIFICACIÓN	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	N° de Profesionales o Técnicos
Aquatic Health	Laboratorio Central	P. Montt	9
	Sucursal	Castro	1
	Sucursal	Coyhaique	1
Biovac S.A.	Laboratorio Central	P. Montt	8
	Sucursal	P. Aysén	4
	Sucursal	P. Cisnes	1
Fundación Chile	Laboratorio Central	P. Montt	8
	Sucursal	Castro	2
	Sucursal	P. Chacabuco	2
Soc. ADL Diagnostic	Laboratorio Central	Castro	11
Diagnotec	Laboratorio Central	P. Montt	5
Especialidades Técnicas Marinas	Laboratorio Central	Llao Llao	2
	Laboratorio Central	Coyhaique	1
Alitec S.A.	Laboratorio Central	P. Montt	2
GAM S.A.	Laboratorio Central	Santiago	6

Gráfico N°1: Laboratorios de Servicio según especialidad por Técnica de Diagnóstico.

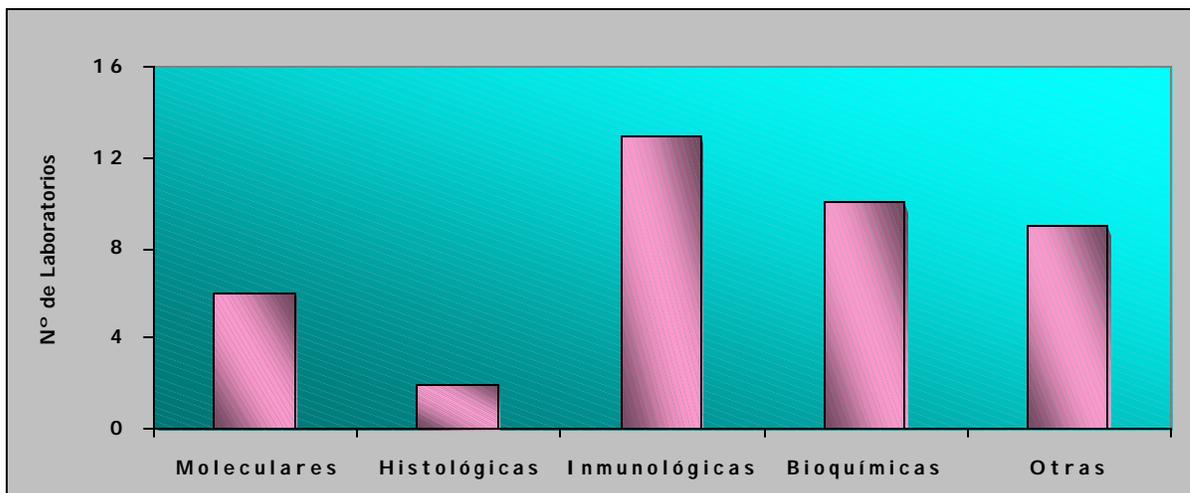
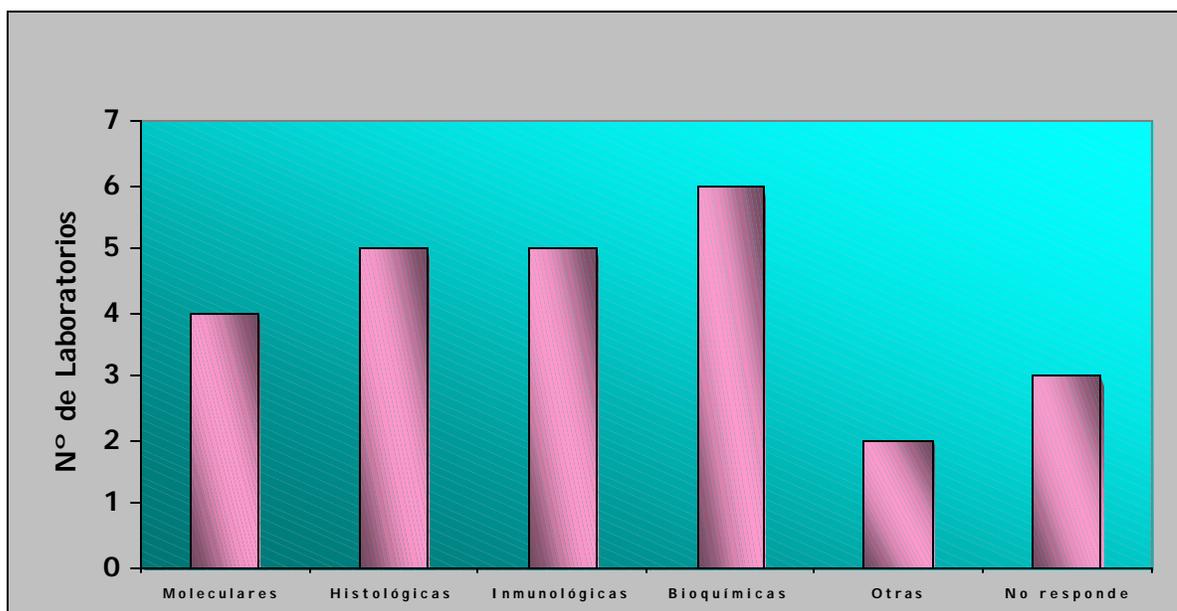


Gráfico N°2: Laboratorios de Investigación según especialidad por Técnica de Diagnóstico.



Cuadro N°20: Laboratorios de Servicio, según Técnica de Diagnóstico Confirmatorio, en Salmónidos, por Tipo de Patógeno

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	TIPO DE PATÓGENO				
	Virus	Bacterias	Rickettsias	Parásitos	Hongos
Microscopía Óptica	0	1	1	12	3
Microscopía Electrónica	1	0	0	0	0
Tinción GRAM	0	2	2	0	0
Tinción Giemsa	0	1	0	0	0
Pruebas Bioquímicas	0	11	0	0	0
Aislamiento en Líneas Celulares	4	0	4	0	0
Seroneutralización	3	2	0	0	0
Inmunofluorescencia	6	12	13	0	0
PCR	6	3	3	4	0
Inmunoblot	1	0	0	0	0
Aglutinación	0	3	0	0	0
ELISA	6	7	7	0	0

Cuadro N°21: Laboratorios de Servicio, según Técnica de Diagnóstico Presunto, en Salmónidos, por Tipo de Patógeno

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	TIPO DE PATÓGENO				
	Virus	Bacterias	Rickettsias	Parásitos	Hongos
Microscopía Óptica	0	9	6	6	6
Tinción GRAM	0	12	10	4	3
Tinción Giemsa	0	3	7	5	4
Aislamiento en Líneas Celulares	6	1	1	0	0
Inmunofluorescencia	0	2	2	0	0
PCR	1	1	1	0	0

Cuadro N°22: Laboratorios de Servicio, según Técnica de Diagnóstico Confirmatorio, en Moluscos, por Tipo de Patógeno

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	TIPO DE PATÓGENO				
	Virus	Bacterias	Rickettsias	Parásitos	Hongos
Microscopía Óptica	0	0	0	1	0
Microscopía Electrónica	0	0	0	1	0
Inmunofluorescencia	0	1	2	0	0

Cuadro N°23: Laboratorios de Servicio, según Técnica de Diagnóstico Presunto, en Moluscos, por Tipo de Patógeno

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	TIPO DE PATÓGENO				
	Virus	Bacterias	Rickettsias	Parásitos	Hongos
Microscopía Óptica	0	1	1	2	1
Tinción GRAM	0	0	1	0	0
Inmunofluorescencia	0	1	1	0	0

Cuadro N°24: Laboratorios de Investigación, según Técnica de Diagnóstico en Salmónidos, por Tipo de Patógeno estudiado

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	PATÓGENO ESTUDIADO				
	BKD	SRS	RTFS	IPN	Vibrios
Clásica	3	2	1	1	0
Histoquímica	1	2	1	1	0
Inmunohistoquímica	2	2	1	2	0
Pruebas Bioquímicas	3	3	4	2	3
IFAT - DFAT	5	4	2	3	0
ELISA	3	3	0	2	0
Inmunodifusión	1	0	0	0	1
Radioinmunoensayo	0	1	0	0	0
Aglutinación	1	1	0	1	0
Neutralización	0	0	0	1	0
Dot Blot	1	3	1	2	0
Western Blot	1	2	1	2	0
Fijación Complemento	0	0	0	0	0
Inmunoelectroforesis	0	0	0	0	0
PCR	2	3	1	2	1
Hibridación	2	3	1	2	0
Secuenciamiento	1	1	1	1	0
North Blot	2	2	1	2	0
Southern Blot	2	2	1	2	0

Cuadro N°25: Laboratorios de Investigación, según Técnica de Diagnóstico en Moluscos, por Tipo de Patógeno estudiado

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	PATÓGENO ESTUDIADO			
	Virus	Bacterias	Protozoos	Hongos
Clásica	0	1	5	0
Histoquímica	0	0	0	0
Inmunohistoquímica	0	0	0	0
Pruebas Bioquímicas	0	4	0	1
IFAT - DFAT	0	0	0	0
ELISA	0	2	0	0
Radioinmunoensayo	0	0	0	0
Aglutinación	0	0	0	0
Dot Blot	0	1	0	0
Western Blot	0	1	0	0
Fijación Complemento	0	0	0	0
PCR	0	1	0	0
Hibridación	0	1	0	0
Secuenciamiento	0	0	0	0
North Blot	0	0	0	0
Southern Blot	0	0	0	0

Objetivo 4.3 :

Analizar, en forma comparativa, las técnicas de diagnóstico utilizadas, nacional e internacionalmente, para cada una de las enfermedades descritas en el objetivo específico 4.1

3.1. Antecedentes

Uno de los problemas que afectan la producción de recursos hidrobiológicos de cultivo, suele ser la aparición de enfermedades infectocontagiosas, éstas se ven favorecidas por la situación de confinamiento de los individuos, especialmente cuando el manejo no es del todo adecuado.

La industria acuícola necesita de rapidez y seguridad en la identificación de sus problemas sanitarios para la toma de decisiones. Debido a que las enfermedades infecciosas constituyen una de las mayores causas de pérdidas en la producción de organismos de cultivo, cualquier esfuerzo para prevenir su incidencia es prioritario. Dentro de estos esfuerzos debemos considerar, en primer lugar, todas las acciones preventivas necesarias incluyendo, mejora genética para dar mayor resistencia a las enfermedades, el cuidado en todas las etapas de manejo y, en caso de presentarse algún problema sanitario, es indispensable un rápido y acertado diagnóstico. Con el objeto de efectuar una correcta evaluación del problema en cuestión, constantemente se está buscando mejorar tanto la toma de muestras como el análisis posterior de las mismas. Un diagnóstico seguro y confiable de enfermedades infectocontagiosas es la herramienta más poderosa para asegurar su control y, en algunos casos, su erradicación.

En relación con las enfermedades infectocontagiosas, cualquier esfuerzo que se haga para un diagnóstico preciso, medidas de prevención y tratamiento adecuadas, contribuirá a mantener y mejorar el estatus sanitario del país.

Existen numerosas y variadas técnicas de diagnóstico para las enfermedades de organismos acuáticos, las que son aplicadas por los laboratorios de diagnóstico nacionales.

Estos laboratorios realizan esfuerzos individuales en cuanto a aplicar las técnicas más avanzadas para el mejor diagnóstico, pero no se cuenta con un documento que unifique y determine cuáles técnicas y qué protocolos deben ser los más adecuados para las diferentes enfermedades.

Es necesario un esfuerzo común de todos los involucrados en el diagnóstico de las enfermedades de manera de unificar criterios y lograr una estandarización de técnicas y protocolos para el diagnóstico de las enfermedades consideradas importantes, ya sea por el efecto causado o por la amenaza de una eventual introducción al país, y así estar preparados para enfrentar los problemas.

Las especies cultivadas son absolutamente diferentes en sus requerimientos y características biológicas, debiendo ser tomadas en consideración estas características al momento de escoger las técnicas de diagnóstico más adecuadas; por ejemplo, moluscos y crustáceos, a diferencia de los peces, no producen anticuerpos a los patógenos, por lo tanto, los métodos de diagnóstico deben ser directos, lo que muchas veces representará pérdida de la sensibilidad del test, porque los antígenos generalmente están en menor proporción que los anticuerpos y, por lo tanto, serán más difíciles de detectar. También deben ser consideradas las características del patógeno, que muchas veces no son capaces de propagarse en los medios de cultivo conocidos o, como en el caso de los virus, muchos no producen efecto citopático, por lo que no son detectables directamente en cultivo de células.

Continuamente, el avance científico permite el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades y perfecciona las técnicas ya existentes. El objetivo de mejorar las técnicas, es aumentar la rapidez del diagnóstico, analizar grandes cantidades de muestras y generar resultados de acuerdo con la realidad. Uno de los aspectos más importantes para conseguir resultados correctos es la técnica utilizada.

Toda técnica debe considerar los siguientes aspectos:

- Exactitud, cercanía del valor generado con el valor real.
- Repetibilidad (Precisión), un método es preciso cuando se obtiene una desviación estandar pequeña, después de varias mediciones.

- Reproducibilidad, es la capacidad de obtener los mismos resultados en varias series de muestras, realizadas bajo las mismas condiciones de operadores, instrumentos y laboratorios, a diferentes momentos, o en condiciones diferentes (operarios, instrumentos y laboratorios).
- Linearidad, un método es lineal cuando el resultado no varía al tomar muestras de diferentes tamaños.
- Sensibilidad, es cantidad más pequeña de anticuerpo, necesaria para dar una reacción positiva en presencia del antígeno. (Madigan et al, 2000).
- Especificidad, es la capacidad de una preparación de anticuerpos para reconocer un antígeno en particular. Un nivel ideal de especificidad es que un anticuerpo no reaccione cruzadamente con ningún otro antígeno y, por lo tanto, no entregue resultados “falso positivos”. La especificidad debe ser definida en términos de reacciones con antígenos controles, positivos y negativos.

Además de estos parámetros, es de primordial importancia la rapidez del diagnóstico y a medida que el número de muestras aumenta, gana importancia la capacidad de automatización y simplicidad de la técnica. Otro aspecto importante a ser considerado es la eficiencia de estos métodos, o sea, obtener los mejores resultados con los recursos disponibles y así lograr el mejor aprovechamiento de los recursos.

Aunque en el desarrollo de nuevas técnicas, la atención se concentra en la calidad del diagnóstico, sin embargo también se deben considerar aspectos ecológicos como la facilidad de manejo y tratamiento de los desechos, gasto de tiempo, de agua, de energía y de material, vida útil de los reactantes, además de la salud del personal de laboratorio. Siempre serán preferidos métodos en que se produzca rapidez y economía sin afectar la exactitud en los resultados.

La mayoría de las técnicas se pueden aplicar a todo tipo de organismos, pero, por lo general, se seleccionan con el objetivo de obtener un diagnóstico acertado y eficiente. Así por ejemplo, la detección de parásitos en casos clínicos, de campo y de cultivo, es relativamente fácil en una observación macroscópica, y aquellos que no son fáciles de detectar, lo pueden ser por una simple observación al microscopio óptico.

Las bacterias son más difícil de detectar, aunque su presencia frecuentemente se puede visualizar por microscopio óptico. El diagnóstico específico, más allá que su morfología gruesa, es casi siempre imposible; sin embargo, la mayoría de los patógenos pueden ser cultivados en el

laboratorio y ser identificados por combinaciones de una serie de pruebas simples, tales como: morfología, tinción, sensibilidad a los antibióticos, análisis bioquímicos, dependencia de nutrientes y sensibilidad a los fagos.

Las infecciones fúngicas pueden ser determinadas similarmente. Como algunas pruebas bioquímicas identifican apenas genéricamente, son necesarias pruebas serológicas para la caracterización de especies.

Los virus, sin embargo, han probado ser mucho más difíciles. Su tamaño y dependencia absoluta de la célula huésped para propagarse han vuelto inútiles los métodos tradicionales. Hasta el desarrollo de los cultivos celulares, en la mitad del siglo pasado, su diagnóstico dependía totalmente de la experiencia del clínico. En algunos casos, un patólogo podía detectar infecciones virales donde existían cuerpos de inclusión o las células afectadas adoptaban una morfología especial.

Con la introducción de la microscopía electrónica (ME) en los años sesenta, fue posible la visualización de las partículas virales en las muestras clínicas, sin embargo, a pesar del incremento en la complejidad, sólo algunos virus con estructuras bien definidas (ej. Adenovirus, poliovirus, herpesvirus y rotavirus) podían ser observados en forma confiable. Diagnóstico por ME de enfermedades causadas por otros virus, especialmente virus con envoltura, tales como influenza, no ha sido posible. La única excepción es cuando las células infectadas contienen cuerpos de inclusión claramente identificables o estructuras relacionadas al virus, tales como nucleocápside.

La mayoría de los diagnósticos virales parten de la detección de una respuesta inmuno-específica, la cual es más rápida y de menor costo que el aislamiento. Aunque la serología es satisfactoria para la mayoría de los casos, casi siempre es más útil en análisis retrospectivo y para monitoreo de la dispersión del virus en la población (vigilancia epidemiológica).

La respuesta inmune puede ser detectada sólo después de un tiempo de la enfermedad inicial del virus. Tales ensayos tradicionalmente han dependido de detectar anticuerpos que inhiben funciones biológicas en el virus e incluyen test de reducción de placas de neutralización (PRNT), ensayos de inhibición de hemoaglutinación (HI) y ensayos de fijación del complemento. Estos ensayos pueden ser específicos y confiables en las manos de un profesional con experiencia, pero son caros, laboriosos y en algunos casos, potencialmente peligrosos.

3.1.1

Clasificación de las Técnicas de Diagnóstico

Las técnicas utilizadas para diagnóstico pueden ser clasificadas en histológicas, inmunológicas, microbiológicas y moleculares.

* Técnicas histológicas

La histología puede ser la primera línea de investigación para el diagnóstico, como en el caso de muchas enfermedades de moluscos y crustáceos, o puede ser una herramienta complementaria a otros test microbiológicos. Esta es una disciplina precisa en detalles, pero no presenta un diagnóstico definitivo para problemas microbiológicos. El propósito más importante es demostrar cambios en la estructura normal de los tejidos, incluyendo células y sus componentes, para lo cual se realiza una examinación gruesa del tejido, fijación, procesamiento y tinción (Bucke, 1972).

Los métodos más comunes para demostrar microorganismos en tejidos son la tinción Gram o la técnica Ziehl-Neelsen que pueden evidenciar presencia de bacterias en secciones histológicas, muy usados en todos los laboratorios de bacteriología. Los organismos gram-negativo son los más comunes y son reconocidos como causantes de la mayoría de las enfermedades bacterianas de peces, ej. Furunculosis, ERM y vibriosis.

La mayoría de los métodos tradicionales para demostrar hongos en mamíferos no sirven en peces, porque los hongos patógenos en organismos acuáticos carecen de la cápsula de mucina, utilizadas en las pruebas corrientes en mamíferos. En peces es posible detectar hongos de tejidos con tinción de hematoxilina. El método de elección para hongos como *Saprolegnia* spp. (en peces de agua dulce), *Aphanomyces* spp. o *Ichthyophonus* spp (en peces marinos) es la técnica de Gomori (GMS).

En relación a los Protozoos, su ciclo de vida no es siempre fácil de detectar con la tinción Hematoxilina-Eosina (H&E), pero la tinción de Giemsa o sus modificaciones, May-Gronwald-Giemsa, demuestra la mayoría de los protozoos. Para un buen contraste de color es mejor tratar con la tinción Gram o Ziehl-Neelsen y, actualmente, con kit para células sanguíneas (Hemacolor). La tinción de tricromo también puede demostrar muchos protozoos, especialmente *Bonamia ostreae* en las ostras (Bucke, 1988).

Los virus en los tejidos sólo pueden ser vistos con ayuda del microscopio electrónico, sin embargo, a partir de los signos clínicos, la patología gruesa y los cambios histopatológicos, se puede sospechar que está envuelta una etiología viral. En peces, las enfermedades virales están asociadas con frecuencia a cambios estructurales de los tejidos y órganos, que terminan con la necrosis celular. Por ejemplo, en salmónidos, la necrosis pancreática infecciosa (IPN) causa principalmente cambios necróticos en el páncreas y la septicemia hemorrágica viral (VHS) da lugar a áreas de necrosis en el riñón y órganos viscerales, además una hemorragia petequiral característica, a través del tejido del músculo esquelético y branquias; estos cambios histológicos pueden ser vistos en secciones teñidas con H&E.

Para proporcionar tempranamente, aunque sólo un diagnóstico presunto, hay técnicas histológicas más específicas que incluyen numerosas técnicas inmunoquímicas, como el método anticuerpo fluorescente para demostrar inclusiones virales y antígenos virales por sección.

* **Técnicas microbiológicas**

Las técnicas de diagnóstico microbiológico parten del cultivo puro del microorganismo a ser estudiado. Después de la aislación del patógeno, que normalmente se realiza en un medio de cultivo enriquecido y en las condiciones de temperatura y pH adecuadas, se procede a la identificación y cuantificación del mismo. Como criterios de identificación son muy usados los esquemas bioquímicos, sin embargo, en ambientes acuáticos, gran proporción de microorganismos no producen colonias en placas de agar; en esos casos, se pueden ocupar algunas otras formas de identificación, como por ejemplo, análisis morfológico con ayuda de métodos microscópicos, tanto de microscopía óptica como electrónica.

* **Técnicas inmunológicas**

La interacción de un anticuerpo con un antígeno forma la base de todas las técnicas inmunoquímicas. Se han desarrollado muchas pruebas inmunológicas basadas en estas interacciones, para determinar la presencia de antígenos o anticuerpos en los organismos de interés. Las pruebas serológicas más comunes son las reacciones de precipitación, resultante de la

interacción entre antígenos solubles y anticuerpos; reacciones de aglutinación, resultante de la interacción entre antígenos en forma de partículas (ej. Antígenos contenidos en células) con anticuerpos; reacciones de neutralización, en que el efecto de determinado patógeno (en general, el efecto citopático del virus en cultivo celular), es eliminado por un anticuerpo específico; reacciones de fijación del complemento, en que ocurre el agotamiento del complemento en presencia del complejo antígeno-anticuerpo; técnicas de fluorescencia, en que los anticuerpos son marcados con fluorescencia; ensayo inmunoenzimático ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), también llamada EIA, en que la reacción antígeno-anticuerpo es detectada por la actividad enzimática de los anticuerpos unidos a una enzima; radioinmunoensayo, donde los antígenos están marcados con radiactividad y la cantidad de radiactividad indicará la cantidad de patógenos de la muestra. La sensibilidad de cada una de las técnicas está indicada en el Cuadro N°26.

Cuadro N°26: Sensibilidad de los ensayos de inmunodiagnóstico

ENSAYO	SENSIBILIDAD (µg anticuerpo/mL)
Reacciones de precipitina:	
- en fluidos	24-160
- en geles (inmunodifusión doble)	24-160
Reacciones de aglutinación:	
- Directa	0.4
- Pasiva	0.08
Radioinmunoensayo (RIA)	0.0008-0.008
ELISA	0.0008-0.008
Inmunofluorescencia	8.0

Muchas de estas técnicas pueden ser mejoradas con el uso de anticuerpos monoclonales (Mab), que son anticuerpos producidos por hibridomas. La ventaja se produce por la alta especificidad y la repetibilidad producto de la producción ilimitada de anticuerpos monoclonales, esto permite la repetición de la prueba en condiciones semejantes.

Los Mab son especialmente indicados para serotipar microbios, lo que muchas veces es esencial en la clasificación, epidemiología y manejo de enfermedades. Comercialmente, ya se

encuentra Mab para los virus de peces IPNV, VHSV, IHNV y CCV.

El tipo principal de inmunoglobulinas detectables por los métodos serológicos más usados son IgG e IgM, siendo que los métodos de aglutinación y fijación del complemento detectan mejor IgM.

Precipitación en Agar (Inmunodifusión):

Técnica serológica utilizada frecuentemente en medicina veterinaria para demostrar y analizar la reacción antígeno-anticuerpo, tiene buena precisión, procedimiento simple y costo relativamente bajo.

Esta técnica permite la visualización del complejo antígeno-anticuerpo como una línea de precipitación, reacción que es mejor visualizada en un medio semisólido, tal como agar o agarosa. La técnica normalmente utilizada en los laboratorios de diagnóstico acuícola es la de difusión dupla, método en el cual el antígeno y el anticuerpo se difunden libremente a través de un medio semisólido en posición horizontal, en una placa de Petri o portaobjetos. La formación de complejos antígeno-anticuerpo depende de la concentración de iones del medio, pH y temperatura. Los determinantes más importantes de la reacción son las concentraciones relativas de antígenos y anticuerpos.

Las ventajas de esta técnica serológica son numerosas, pudiendo un técnico de laboratorio identificar agentes infecciosos y anticuerpos muy fácilmente con reactivos de referencia. Las desventajas son la poca sensibilidad en relación a otras pruebas serológicas y que las reacciones son más lentas y menos visibles que la aglutinación. La mantención de un equilibrio adecuado entre antígeno-anticuerpo es importante para la eficiencia de esta técnica inmune. Esta prueba serológica detecta principalmente los anticuerpos IgM e IgG.

Aglutinación (TA):

Es un fenómeno serológico utilizado para la detección de anticuerpos específicos, “aglutininas”, presentes en la sangre o en el suero. Se caracteriza por la formación de grumos (aglutinación), que indican la presencia del complejo antígeno-anticuerpo. La formación de grumos es considerada positiva, pues muestra la reacción del antígeno frente al anticuerpo utilizado.

Los anticuerpos difieren en su capacidad de promover la aglutinación, siendo las inmunoglobulinas del tipo IgM consideradas más eficientes que las del tipo IgG e IgA debido a su conformación pentamérica en la producción de esta forma de reacción.

La unión de los anticuerpos con los determinantes antigénicos en la superficie de las células va formando una red de moléculas de antígeno-anticuerpo cada vez mayores, pudiendo ser observados a simple vista o con la ayuda de lentes. La formación de la red de aglutinación ocurre sólo cuando hay una equivalencia entre antígeno y anticuerpo; en situaciones de exceso de uno o de otro, la aglutinación es inhibida.

Las pruebas de aglutinación están disponibles para los patógenos más comunes y son útiles cuando hay buenas razones para sospechar de un organismo particular; sin embargo, hay muchos falsos negativos y reacciones no específicas. Esta técnica es más sensible que las reacciones de precipitación.

Hemoaglutinación (HA):

Algunos virus poseen en su superficie estructuras capaces de combinarse con receptores específicos, presentes en los eritrocitos de determinadas especies y producir el fenómeno de hemoaglutinación (HA). Tales estructuras, denominadas *hemoaglutininas*, son constituídas usualmente por glicoproteínas.

El acoplamiento de la hemoaglutinina con el receptor de la membrana del eritrocito de una especie dada, es regido por la especificidad estructural, factores como el pH, concentración y composición iónica del medio, temperatura, etc.

Al contrario de la reacción de hemoaglutinación (HA) que simplemente revela una actividad biológica del agente, la reacción de inhibición de la aglutinación (HI) es un método que puede ser empleado para identificar un agente específico o para medir los anticuerpos séricos. La prueba de inhibición de la aglutinación es un método conveniente y económico que ha sido extensamente empleado para el control de diversas enfermedades. Es una prueba serológica cuantitativa, cualitativa, sensible y específica, midiendo principalmente las inmunoglobulinas del tipo IgG.

Neutralización (N)

Los ensayos de neutralización son utilizados para identificación viral y para identificación y cuantificación de anticuerpos. Estos ensayos están basados en el principio según el cual el anticuerpo viral se liga en el virus específico y neutraliza la infectividad o su acción viral sobre un sustrato determinado. Estos ensayos pueden incluir la inhibición de la formación de placas, efecto citopático (CPE), inhibición metabólica y hemadsorción. El empleo de cultivos celulares en ensayos de neutralización, es útil para virus que produzcan efectos citopáticos característicos.

Los ensayos de neutralización miden la capacidad del anticuerpo, cuando se mezcla con el antígeno, de neutralizar su actividad biológica y medir los niveles de anticuerpos séricos. Como método de diagnóstico y de investigación, esta prueba es comúnmente empleada para la identificación de virus, diferenciación entre cepas virales o para medir de manera cualitativa y cuantitativa el nivel de anticuerpos específicos presentes en un suero. Los ensayos de neutralización son altamente específicos y extremadamente sensibles. Esta técnica detecta principalmente los anticuerpos del tipo IgG e IgM.

Prueba Inmunoenzimática (ELISA):

El ensayo ELISA fue desarrollado en los años setenta. Primeramente fue usado en medicina humana y más recientemente ha sido empleado para el diagnóstico de muchas enfermedades de animales, incluyendo virus, bacterias, micoplasmas, parásitos, micotoxinas, detección de drogas, hormonas, proteínas, etc, volviéndose un procedimiento frecuente de laboratorio, escogido para monitorear anticuerpos y antígenos en poblaciones de peces. La técnica es simple, específica, sensible, rápida, automatizada y permite trabajar con una gran cantidad de muestras al mismo tiempo.

Es una reacción serológica que se basa en el uso de antígenos y anticuerpos marcados con enzimas, en la cual el complejo resultante posee actividad inmunológica y enzimática. Por estar uno de sus componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima y ligado a un soporte inmunoabsorbente, el complejo formado queda inmovilizado. De esta manera, agregando un sustrato cromogénico específico a la enzima, ocurrirá el desarrollo del color. El producto colorimétrico formado puede ser visualizado o medido con el auxilio de un fotolorímetro o de un espectrofotómetro (Abbas et al., 1997).

Las informaciones obtenidas por medio de ELISA han sido muy útiles para determinar el perfil serológico de una población, así como para monitorización epidemiológica de la mayoría de las enfermedades importantes, de una manera rápida.

Inmunofluorescencia (FAT):

Técnica de observación de la reacción antígeno-anticuerpo por medio de la conjugación de uno de los reactantes con sustancias fluorescentes, haciendo uso de un microscopio de fluorescencia para su visualización.

Las sustancias orgánicas (isotiocianato de fluoresceína (FIT), rodamina, etc.), llamadas fluorocromos, tienen propiedades de emitir luz de longitud de onda mayor que la luz incidente. La inmunofluorescencia es un método de detección de constituyentes celulares o de anticuerpos séricos y celulares. La técnica directa es muy específica, presentando menos fluorescencia inespecífica (ruidos de fondo) que la técnica indirecta, pero la técnica indirecta presenta otras ventajas (Santos & Silva, 2000):

- Varias moléculas de antígeno pueden ligarse a un anticuerpo fluorescente antiinmunoglobulina, haciendo más evidente la fluorescencia.
- Varios anticuerpos pueden ser investigados con el mismo conjugado.
- Posibilita la identificación de clases de inmunoglobulinas
- Permite una determinación semicuantitativa de los anticuerpos presentes en los sueros, por medio de la dilución de los mismos.

Fijación del complemento (FC):

El complemento es un sistema complejo de proteínas séricas que pueden ser activadas por una cascada proteolítica, causando daños irreparables a las membranas celulares. Este sistema es activado por la interacción antígeno-anticuerpo o agregados de gammaglobulinas. Actualmente numerosas enfermedades humanas y animales han sido diagnosticadas por la reacción de fijación del complemento (FC). La principal desventaja de este ensayo es su complejidad, particularmente debido a la preparación y padronización de los reactivos necesarios (Santos & Silva, op. cit.).

* **Técnicas Moleculares (Diagnóstico Basado en ADN)**

Nuevas técnicas no inmunológicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están siendo aplicadas de manera experimental con el objetivo de obtener resultados rápidos y confiables, adaptados a la rutina de grandes cantidades de muestras. Su uso se incrementará en el futuro, a medida que vaya siendo generada la información genética necesaria para su aplicación (secuencia genómica del patógeno) (Abbas et al, 1997).

La amplificación por PCR está probando ser una valiosa herramienta para monitorear infecciones virales o bacterianas. Los procedimientos convencionales de diagnóstico están basados en la capacidad de crecimiento de los organismos en cultivo o en la posibilidad de detectar su presencia en animales usando anticuerpos, lo cual puede requerir algunas semanas para el diagnóstico. El test basado en PCR es más sensible y más rápido que las pruebas convencionales, detectando las escasas células infectadas entre gran cantidad de células no infectadas.

El ARN, ADN o proteína de un agente infeccioso en una muestra clínica, pueden ser utilizados para ayudar a identificar el patógeno. En muchos casos, el agente se detecta e identifica de esta manera, aunque no sea posible aislarlo o detectarlo por métodos inmunológicos. Las ventajas de las técnicas moleculares consisten en su sensibilidad, especificidad y seguridad.

En términos de seguridad, las técnicas moleculares no exigen el aislamiento del agente infeccioso y pueden ser efectuadas en muestras inactivadas o extractos fijados químicamente. En virtud a su sensibilidad, es posible detectar muestras muy diluidas o ADN en un determinado tejido (ej. ADN viral), aunque el agente no se esté replicando o produciendo otras señales de infección. La PCR es tan sensible que, con el uso de controles apropiados, puede detectar e identificar genomas virales en los primeros estados de la infección. Además, el producto de la reacción de PCR puede tener su secuencia de nucleótidos determinada por la confirmación inequívoca de la diagnosis. La especificidad potencial de estas técnicas permite la distinción de las cepas sobre la base de diferencias en el genotipo (mutantes) (Abbas et al, op cit.).

En el Cuadro N°27 se resumen las principales técnicas Moleculares.

Cuadro N°27: Técnicas Moleculares, su finalidad y ejemplos clínicos

TÉCNICA	FINALIDAD	EJEMPLOS CLÍNICOS
RFLP	Comparación de ADN	Epidemiología Molecular
Electroforesis del ADN	Comparación de ADN	Diferencias entre cepas virales (hasta 20.000 bases)
Electroforesis en gel de campo pulsado	Comparación de ADN (Grandes segmentos de ADN)	Comparación de cepas de estreptococos.
Hibridación <i>in situ</i>	Detección y localización de secuencias de ADN en tejidos	Detección de Virus ADN sin replicación (ej. Citomegalovirus)
Dot Blot	Detección de secuencias de ADN en solución	Detección de ADN Viral
Southern Blot	Detección y caracterización de secuencias de ARN por su tamaño	Identificación de cepas virales específicas
PCR	Amplificación de muestras muy diluidas de ADN	Detección de virus ADN
RT-PCR	Amplificación de muestras muy diluidas de ARN	Detección de Virus ARN
SDS-PAGE	Separación de proteínas por peso molecular	Epidemiología molecular de virus
Western Blot	Detección y caracterización de secuencias de ADN por su tamaño	Identificación de cepas virales específicas

En el caso del test molecular PCR, la detección de un patógeno se basa en la amplificación de un segmento único, relativamente pequeño, de ADN específico del organismo a ser estudiado. En el caso de virus ARN, es necesario que el material genético sea convertido en ADN complementario por la enzima Transcriptase Reversa (RT-PCR), antes de iniciar el proceso de PCR (Madigan et al, 2000).

En numerosos estudios, PCR está revelándose como un promisorio método de diagnóstico, porque el test es muy sensible y específico y, en el caso de patógenos de difícil propagación, como es el caso de muchos virus y bacterias intracelulares como la propia *Renibacterium* causante de BKD, no necesita del patógeno en forma viable para obtener resultados positivos, ampliando grandemente el espectro de muestras útiles para el diagnóstico.

PCR es una alternativa tan rápida como EIA, pero la sensibilidad puede ser mayor, a pesar que las moléculas blanco del EIA son más numerosas que las moléculas blanco de PCR (ADN). La reacción en cadena de la polimerasa reproduce exactamente copias ilimitadas de ADN, permitiendo el acceso a una información genómica fundamental en el diagnóstico de enfermedades, principalmente aquellas de difícil diagnóstico por los métodos convencionales.

La desventaja, como en otras técnicas de diagnóstico, es que el aumento de la sensibilidad frecuentemente es compensada por la posibilidad de falsos positivos, esto genera una alta dependencia de los resultados a las condiciones en que es realizada la técnica. La técnica debe ser efectuada con especial atención a la inclusión de adecuados controles positivos y negativos, además de todo tipo de precauciones para evitar contaminaciones con material genético de PCRs anteriores en el lugar de procesamientos de las muestras.

La aplicación de PCR es suficiente para la mayoría de los patógenos, pero en algunos casos específicos, como la detección de especies muy cercanas, bajos títulos, virus ARN, etc., puede ser aplicada con algunas modificaciones. Las más comunes son: RT-PCR (transcriptase reversa-PCR), nested-PCR (PCR “anidado”), RAPD (random amplified polymorphic ADN), etc.

3.1.2 Elección del método de diagnóstico

La elección adecuada de un método de diagnóstico depende del objetivo buscado por el laboratorio, el que puede ser:

- Diagnóstico de una infección clínica
- Descubrimiento de portadores
- Caracterización de los agentes infecciosos

En los laboratorios de servicio, la rapidez para obtener los resultados condiciona la técnica que es elegida para el diagnóstico. Si los resultados se requieren en forma rápida, se elegirán los métodos inmunológicos directos desde tejido. Si los resultados pueden ser entregados con más tiempo, es posible que se elijan métodos de aislamiento de los patógenos previo a realizar la identificación.

Para el caso de los diagnósticos virales, el criterio de rapidez se encuentra estrechamente asociado a las prácticas de cultivo, pues si se requiere el traslado de un lote de peces o la introducción de un lote nuevo a un plantel de cultivo, la rapidez es un criterio de gran relevancia, pero en el caso que exista un brote declarado de alguna infección viral, el diagnóstico puede esperar algunos días, sin que ello afecte al curso de la infección.

Se debe tomar en cuenta también al personal técnico especializado disponible, pues las técnicas IFAT, ELISA y PCR directas desde tejidos exigen que la persona que efectúa el trabajo dedique todo el día a ellas (suponiendo que los peces llegan en la mañana) porque las operaciones deben seguir una continuidad. Si se elige el método de aislamiento del agente viral en cultivos celulares una vez que se inoculan las células con la muestra de interés, basta examinar las células algunos minutos una vez por día, lo que permite al analista disponer de mayor tiempo para realizar otras actividades. Por esta razón, la mayoría de las caracterizaciones virológicas son efectuadas por laboratorios de investigación, pues en estos lugares no se justifica que alguien dedique todo su tiempo para una sola actividad y por otro lado el aislamiento de los virus en cultivos celulares permite conservar las cepas virales para posteriores estudios.

Se puede señalar entonces que:

- los Laboratorios de Servicio priorizan la rapidez y simplicidad de método, y
- los Laboratorios de Investigación eligen las técnicas que permiten conservar a los agentes para posteriores estudios.

3.2. Desarrollo Metodológico

Dada la diversidad de técnicas de diagnóstico, actualmente en uso en Chile y en el extranjero, identificadas en el objetivo 4.2, se realizó un análisis comparativo con el objeto de definir cuales son las que ofrecen mayores ventajas para ser consideradas en la elaboración del “Manual de Técnicas y Protocolos” propuesto en el objetivo 4.4.

Para este análisis comparativo se hizo uso de la información contenida en la base de datos de los laboratorios y técnicas empleadas por éstos, emanada tanto de las encuestas a laboratorios como de la recopilación bibliográfica y de reportes de laboratorios nacionales.

Se consultaron además los manuales de procedimiento aceptados internacionalmente como son las publicaciones de la OIE, de la Comisión de la Comunidad Europea para la Salud de los Organismos Acuáticos, de la American Fisheries Society y otras disponibles. Esto se complementó con revisión de publicaciones y consultas a expertos internacionales.

Este análisis se realizó para cada una de las enfermedades de importancia en función de las ventajas y desventajas de cada técnica descrita, considerando características identificadas para tal efecto y entre las que se podrían mencionar las siguientes:

- Disponibilidad de insumos
- Precio de insumos
- Costo de análisis
- Sensibilidad
- Confiabilidad
- Equipos, especificidad
- Objetividad de su interpretación
- Rapidez
- Posibilidad de automatización
- Nivel de especialización
- Experiencia

Una vez realizado el análisis, se propone una jerarquización de técnicas, la que se compara con la actual aplicación de éstas por parte de los laboratorios. Esto permitirá conocer la distribución de frecuencias de uso de las técnicas por los laboratorios nacionales para cada enfermedad y la relación de esta frecuencia con la jerarquía de la técnica.

Los resultados obtenidos han sido considerados en la proposición de técnicas y protocolos del objetivo 4.4

3.2.1. Propuesta de Jerarquización de Técnicas de Diagnóstico

Con el fin de establecer una jerarquización de técnicas de diagnóstico, en primer lugar, se asignó un valor de la escala de 1 a 3 puntos a cada variable técnica y de eficiencia, consideradas

en este estudio, donde el valor 1 indica que la variable es de poca importancia dentro de la técnica. Luego, a cada técnica se le asignó un puntaje calculado como la suma de las puntuaciones de sus correspondientes variables. Este procedimiento se explicita en el Cuadro N°28.

La puntuación resultante sitúa entre las técnicas más recomendables a ELISA y PCR, seguidas por la Neutralización e IFAT. Esta jerarquización coincide con la frecuencia de uso de técnicas por parte de los laboratorios nacionales, especialmente los de mayor demanda de servicios de diagnóstico.

Cuadro N°28: Asignación de puntajes para la Jerarquización de Técnicas de Diagnóstico, según variables técnicas y de eficiencia

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	VARIABLES						PUNTAJE DE TECNICAS
	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	CONFIABILIDAD	OBJETIVIDAD	RAPIDEZ	AUTOMATIZACIÓN	
ELISA	3	3	3	3	3	3	18
IFAT	3	3	3	2	3	1	15
PCR	3	3	3	3	3	3	18
Neutralización^(*)	3	3	3	3	2	1	15
Aislamiento^(*)	3	1	3	3	2	1	13
Inmunoblott	3	3	3	2	2	1	14
Inmunodifusión	1	3	3	2	3	1	13
Aglutinación	2	3	3	2	3	1	14
Histológicas (Moluscos)	1	1	3	1	1	1	8

(*) En patógenos que producen efecto citopático: 1= escaso, 2= medio, 3= alto

3.2.2. Frecuencia de uso de las Técnicas a nivel nacional

De acuerdo a lo informado por los laboratorios nacionales, el Cuadro N°29 muestra el porcentaje de los laboratorios consultados que se han especializado en cada una de los distintos tipos de técnicas de diagnóstico.

Cuadro N°29: Laboratorios según Especialidad por Tipo de Técnica, para cada Tipo de Laboratorio

TIPO DE TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO	TIPO DE LABORATORIO	
	De Servicios	De Investigación
Immunológicas	13	5
Bioquímicas	10	6
Moleculares	6	4
Histológicas	2	5

Si se considera el agente investigado, desde el cuadro N°20 del Objetivo 4.2, se puede observar que, de acuerdo a lo informado por los Laboratorios de Diagnóstico, las técnicas confirmatorias usadas con mayor frecuencia son:

- Inmunofluorescencia, RT-PCR y ELISA, seguidas por Aislamiento en cultivos celulares, para agentes virales;
- Inmunofluorescencia seguida por Pruebas Bioquímicas, en algunos casos en forma de kits (serie API) y, posteriormente, ELISA, para bacterias;
- Inmunofluorescencia y ELISA, en el caso de rickettsias; y
- Observación microscópica, para parásitos y hongos.

Durante el desarrollo del proyecto y a la luz de la discusión realizada en el Seminario-Taller, se consideró insuficiente la información obtenida en la encuesta a los Laboratorios de Servicios, en relación a los detalles de las técnicas de diagnóstico que utilizan, por lo cual se procedió a elaborar un nuevo cuestionario. Este cuestionario fue aplicado mediante entrevista personal sólo a los laboratorios que realizan el mayor porcentaje de diagnósticos a nivel nacional, incluyendo sólo las enfermedades importantes, que correspondían a las de Categoría II, de

importancia económica y que están presentes en Chile. De los 5 laboratorios seleccionados, uno no respondió.

3.2.3. Encuesta Técnica

Considerando que el objetivo de este nuevo cuestionario era profundizar en los protocolos de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de las enfermedades virales y bacterianas importantes en Chile y, de esta forma, favorecer la estandarización de las técnicas realmente utilizadas por los laboratorios, se diseñaron 3 formularios, los cuales estaban relacionados con los siguientes temas:

- Procedimientos para la toma y mantención de las muestras. Aquí se consultó también acerca de la frecuencia de calibración de los equipos. (*Formulario C, Anexo II*)
- Procedimientos para los análisis virales. (*Formulario D, Anexo II*)
- Procedimientos para los análisis bacterianos. (*Formulario E, Anexo II*)

Las respuestas obtenidas de la aplicación de los instrumentos, se presentan a continuación.

3.2.3.1. Procedimientos para toma y mantención de muestras

En relación con el tema de la frecuencia de calibración de los equipos, consultado con el fin de establecer el nivel de cumplimiento de las normas de los laboratorios de análisis, se obtuvo lo siguiente:

- Todos los laboratorios realizan este procedimiento; sin embargo, la frecuencia es diferente, siendo la menor la frecuencia anual. En general, los instrumentos los calibran los mismos proveedores, excepto en un caso en que la calibración la realiza una empresa especializada (Cesmec).
- Todos los laboratorios llevan registros de la información procesada, donde cinco años es el mayor tiempo de mantención de registros y dos años el tiempo menor.
- Todos los laboratorios realizan, en forma esporádica, la comprobación de resultados mediante el envío a laboratorios externos.

En cuanto al tema de la obtención de muestras se puede afirmar que:

- Los muestreos para peces sintomáticos se realizan en forma dirigida.
- Para los peces asintomáticos, lo más frecuente es tomar 60 ejemplares para detectar una prevalencia de 5%, tal como lo recomienda el Manual de la OIE.
- El medio de transporte más utilizado para las pruebas histológicas, es la formalina al 10% y conservación a temperatura ambiente.
- En los cultivos bacterianos, el transporte de la muestra se realiza a bajas temperaturas, sin medio de transporte y el tiempo de procesamiento varía entre una y veinticuatro horas.
- Los medios con muestras virales se trasladan a bajas temperaturas (máx. 4°C), en general en medios MEM + Antibiótico y el tiempo de procesamiento varía entre 6 y 48 horas.
- En el caso de la técnica RT-PCR no existe uniformidad en la forma del transporte, ya que algunas veces se utiliza RNA later (fijador) y en otros casos, temperaturas de -20°C.
- Cuando las muestras provienen de fuentes externas al laboratorio, el criterio de aceptación es el buen estado de las muestras. Para el caso de los alevines de peces, se trasladan vivos en agua con O₂ y los peces adultos en hielo.
- Todos los laboratorios realizan pruebas hematológicas, con toma de muestras desde la vena caudal.
- La mayoría de los laboratorios realizan frotis sanguíneos, para los cuales utilizan diferentes métodos de fijación.
- En cuanto a las pruebas histológicas, éstas sólo se realizan en ausencia de un diagnóstico positivo con las técnicas rutinarias.
- Los frotis de riñón se realizan mediante impronta o macerado del riñón completo, generalmente 3 frotis por pez, los cuales se utilizan para Tinción Gram, IFAT y otras tinciones.

3.2.3.2. Procedimientos Virales

En relación con los procedimientos virales se puede apreciar lo siguiente:

- Líneas celulares utilizadas para los aislamientos específicos: todos los laboratorios utilizan la línea CHSE-214 proveniente de ATCC para IPN y, generalmente, utilizan la línea SHK-1 de origen noruego, para ISA.
- En general, los laboratorios hacen un análisis de sensibilidad de la línea celular, cada 100-120 pasajes.
- La descontaminación de los microorganismos se realiza mediante un cocktail de antibióticos o filtros (0,45-0,22 μ m). Todos los laboratorios utilizan las concentraciones y antibióticos (penicilina, estreptomycin y fungizona) recomendados por la OIE. Estos antibióticos se utilizan en el medio de transporte, muestra triturada o sobrenadante de la muestra centrifugada.
- El recipiente más empleado para el aislamiento viral corresponde a microplacas de pozos de diferentes diámetros.
- Se considera una muestra negativa después de realizados 1 a 3 pasajes ciegos.
- El método identificatorio más común para IPN e ISA es el IFAT indirecto desde líneas celulares, además del RT-PCR.
- Los laboratorios adquieren el anticuerpo específico para IPN y el conjugado desde BiosChile.
- En el caso del virus ISA, el laboratorio declara que el anticuerpo fue cedido por un laboratorio de investigación y el conjugado proviene de Sigma.
- En IPN e ISA, los controles positivos provienen del aislamiento realizado en cada laboratorio y de diferentes cepas provenientes de Norte América.
- En los laboratorios encuestados no se utiliza ELISA, ni tampoco seroneutralización, en forma rutinaria.
- Las técnicas moleculares para detectar IPN e ISA (RT-PCR) se realizan desde tejidos y cultivos celulares, empleando para la mantención y transporte, el RNA later o bajas temperaturas.

- Para la purificación y extracción de ARN, los laboratorios utilizan variados métodos a seguir: tampón de lisis con proteinasa K, la columna Quiagen (Promega), Trizol (Life Technologies) y Método Fenol-Cloroformo. Específicamente para IPN, se utiliza IPNV-Genotest II de BiosChile.
- La enzima utilizada es M-MLV transcriptasa reversa (Life Technologies).
- Los primers utilizados para ISA son los mencionados en el Manual de la OIE y los primers usados para IPN son los descritos por Blake et al. 1995.
- Las temperaturas utilizadas en cada ciclo de PCR son:

CICLO		IPN	ISA
Desnaturalización	T°	94°C	94°C
	Tiempo	60 seg.	60 seg.
Anillamiento(acoplamiento)	T°	55°C	58°C
	Tiempo	120 seg.	150 seg.
Extensión	T°	72°C	72°C
	Tiempo	90 min.	120 min.
N° de ciclos		35	40

3.2.3.3. Procedimientos Bacterianos

En cuanto a los procedimientos bacterianos, se puede apreciar que:

- Los medios de cultivo que se utilizan en forma rutinaria para el aislamiento primario son:
 - TSA/TSA + sal
 - SHIEH
 - Agar MAOA modificado
 - KDM-2 - KDM-C
 - Agar MacConkey
- El crecimiento se mantiene entre 18 y 25 °C, la mayoría de los laboratorios mantiene los medios de crecimiento entre 18 y 20°C.

- Las placas se incuban al menos durante 5 días, excepto los medios KDM-2 y KDM-C que se incuban entre 28-30 días.
- Para el aislamiento de *Aeromonas* y *Pseudomonas* también se utiliza Medio BHIA, Agar sangre y Medio GSP.
- Las pruebas bioquímicas de identificación presunta se basan en la literatura extraída del Manual Bergey, Libro y Código de API 20-E y otras publicaciones científicas.
- Para Flavobacterias, API ZYM y API Strep se utiliza el Kit API y API20 NE.
- Generalmente, se utiliza ELISA, FAT directo e indirecto y PCR para los patógenos BKD y SRS.
- Para *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophilus* se utiliza la prueba de aglutinación. El resto de las bacterias se determinan mediante pruebas bioquímicas y Kit API.
- Generalmente, se utiliza un kit de ELISA directo, como procedimiento confirmatorio, el cual se aplica desde tejidos, tanto para BKD como para SRS.
- Ningún laboratorio consultado utiliza PCR para bacterias.

Es preciso hacer notar que, aunque en la entrevista personal con los encargados de los laboratorios consultados, éste respondió las preguntas del cuestionario, sin embargo, se limitaron a entregar respuestas generales, reservándose parte de la información específica requerida.

El análisis de sus respuestas indica que:

- a) todos los laboratorios utilizan como base las recomendaciones del Manual de la OIE, los procedimientos establecidos en el Blue Book y las indicaciones proporcionadas por los fabricantes de los kits de análisis, siendo BiosChile y DiagXotics los principales proveedores requeridos de estos Kits en el país.
- b) los criterios que priman para la elección de las técnicas, por parte de los laboratorios, serían en orden de importancia:
 - Rapidez
 - Disponibilidad de reactivos en el mercado.
 - Simplicidad de aplicación.
 - Sensibilidad

- c) las técnicas más utilizadas por los laboratorios chilenos, según el tipo de patógeno son:
- IFAT y RT-PCR para virus.
 - IFAT, ELISA y Aglutinación, para bacterias
- d) siendo la neutralización, una técnica de alta sensibilidad recomendada por la OIE, no es utilizada por ninguno de los laboratorios consultados.

A pesar de lo indicado anteriormente, en el Manual de Técnicas de Diagnóstico para Enfermedades de Salmónidos se incluyen las técnicas de neutralización y ELISA para la detección de virus, con el fin de contar con una variedad de posibilidades al momento de la elección por parte de los laboratorios.

Objetivo 4.4:

Proponer protocolos estandarizados para las diferentes técnicas de diagnóstico de enfermedades de recursos hidrobiológicos en nuestro país.

4.1. Antecedentes

La importancia de contar con un adecuado plan de vigilancia, prevención y control de las enfermedades que afectan a los recursos hidrobiológicos de cultivo, hace necesario realizar una revisión y selección de las técnicas y protocolos de diagnóstico, como también de la capacidad de diagnóstico con que cuentan los laboratorios del área. Sumado a esto se requerirá impulsar la utilización de métodos normalizados tanto en protocolos de técnicas, como en requerimientos mínimos para acreditación de laboratorios de diagnóstico, establecidos en una proposición de manual y revisado tanto por expertos nacionales como internacionales.

4.2. Desarrollo Metodológico

Para cumplir con este objetivo se realizaron las siguientes actividades:

- Elaboración de un manual conteniendo los procedimientos de técnicas de diagnóstico para las enfermedades de mayor relevancia en cultivos de salmónidos y moluscos en nuestro país, obtenidas en el desarrollo de los objetivos 4.1, 4.2 y 4.3 de este proyecto.
- Realización del Seminario Taller “*Políticas de manejo sanitario de recursos hidrobiológicos de cultivo*”, con la participación de expertos internacionales, enfocado a la revisión de todos los objetivos del proyecto, con énfasis en los requerimientos de acreditación de los laboratorios de diagnóstico y funciones y deberes de los laboratorios de referencia.

- Revisión de los procedimientos de acreditación de laboratorios de acuerdo a las normas estándares y a la realidad nacional, para la elaboración de una propuesta.

4.2.1. Manual de Procedimientos

Para la confección del Manual de Técnicas y Protocolos Estandarizados destinados al Diagnóstico de Enfermedades de Peces y Moluscos se utilizaron como referencia:

- a) las pautas de la OIE, contenidas en sus publicaciones,
- b) informativos periódicos de las reuniones de la Comisión para las Enfermedades de Organismos Acuáticos,
- c) *Blue Book* y publicaciones de revistas científicas especializadas.

Por otro lado, también se consideró la realidad de los laboratorios chilenos, información que fue recopilada a través de las dos encuestas descritas en el Objetivo 4.1. Los procedimientos establecidos en los manuales fueron, en lo posible, expresados de manera clara y fácil de aplicar por los laboratorios nacionales, dando orientaciones concretas y fundamentadas ante situaciones nuevas, lo que permitirá solucionar y/o evaluar riesgos asociados a enfermedades infecciosas.

Los procedimientos contenidos en este manual podrán ser modificados de acuerdo al avance futuro de la ciencia y tecnología y ante la eventual aparición de nuevas patologías o la introducción de nuevas especies hidrobiológicas.

El manual de procedimientos constituye el ANEXO III de este informe y se presenta en documento separado bajo el nombre de:

*“MANUAL DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO PARA ENFERMEDADES DE SALMONIDOS,
MITILIDOS, PECTINIDOS Y OSTREIDOS”.*

4.2.2. Seminario Taller

Con el objetivo de tener una visión general de lo que ocurre en el ámbito internacional en el tema de la categorización de las enfermedades y de recopilar mayor información acerca del papel que deben cumplir los Laboratorios de Referencia, los días 18 y 19 de Octubre del 2001, se realizó el Seminario Taller "*Políticas de Manejo Sanitario de Recursos Hidrobiológicos de Cultivo*".

Este seminario taller fue fundamentalmente diseñado para uniformar criterios sobre:

- a) Requerimientos mínimos para acreditar laboratorios de diagnóstico y, además, funciones y deberes de un Laboratorio de Referencia;
- b) Estandarización de técnicas de diagnóstico;
- c) Categorización de enfermedades importantes para Chile; y
- d) Análisis de protocolos que acompañan a las técnicas estandarizadas.

El Seminario Taller estuvo dirigido a investigadores y profesionales que se desempeñan en los laboratorios de diagnóstico de enfermedades y en los laboratorios de investigación asociados al diagnóstico de enfermedades de peces y moluscos. A esta actividad asistieron aproximadamente cuarenta personas por día, entre las cuales se destaca la participación de representantes, tanto de organismos gubernamentales del sector pesquero (Sernapesca, Subsecretaría de Pesca) como de las Asociaciones de Productores de Salmón y de Moluscos, además de expertos extranjeros.

En las sesiones de este Seminario Taller, se dieron a conocer los resultados preliminares del proyecto y los tres expertos de la OIE invitados entregaron antecedentes acerca de las regulaciones que rigen el comercio internacional de los animales acuáticos y acerca de los laboratorios de referencia nacionales e internacionales. Los expertos extranjeros invitados fueron:

- Dr. Barry Hill, Secretario General de la OIE, quién se refirió a los criterios de categorización de las enfermedades en el ámbito internacional y a las políticas internacionales para el mejoramiento de los laboratorios de diagnóstico y las organizaciones que participan en su acreditación.

- Dra. Ellen Ariel, del Danish Veterinary Laboratory, el cual actúa como Laboratorio de Referencia de la OIE para las enfermedades de peces. Su charla estuvo enfocada a las funciones y deberes de los Laboratorios de Referencia Nacionales en la Unión Europea.
- Dr. Franck Berthe, del Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie (IFREMER), Laboratorio de Referencia de la OIE para las enfermedades de moluscos, quién se refirió a las regulaciones y procedimientos para el diagnóstico de las enfermedades de moluscos, de acuerdo a los requerimientos de la OIE y de la Unión Europea.

Como resultado del Seminario Taller y de la visita de los expertos, se realizaron modificaciones tendientes a complementar y mejorar la información obtenida sobre las técnicas, sus protocolos y los requerimientos mínimos de acreditación de laboratorios de diagnóstico de enfermedades de los grupos de organismos estudiados en este proyecto. Además, se tomaron decisiones respecto de las técnicas y protocolos más adecuados, tanto para la proposición de estandarización de técnicas contenidas en los manuales, como para definir los requerimientos que se deberán considerar para la acreditación de los laboratorios.

Todas las modificaciones realizadas a partir del Seminario Taller fueron incorporadas en los objetivos correspondientes.

4.2.3. Revisión de Procedimientos de Acreditación de Laboratorios

Acreditación es el procedimiento por el cual un organismo con autoridad técnica reconoce la competencia de un laboratorio que cumpla con requisitos específicos para realizar determinados tipos de ensayo, por lo tanto, es posible acreditar por áreas de ensayo (por ejemplo químicas, físicas, biológicas etc.).

Los laboratorios de análisis, dentro de los que estarían considerados los laboratorios encargados de realizar diagnósticos de enfermedades de organismos acuáticos de cultivo, están sometidos a fuerte competitividad. Esto, sumado a la tendencia mundial de incrementar la calidad, debido a las exigencias actuales de mejor calidad de vida, protección de la salud y el ambiente, preocupación por la calidad de los productos a consumir y los que se desechan, obligan a la implementación de un sistema de garantía de calidad para estos laboratorios. El beneficio directo de la implementación de la garantía de calidad, es proporcionar un aval fundamentado sobre la credibilidad de la información generada.

La propuesta de requerimientos mínimos para acreditar laboratorios se basa fundamentalmente en:

- Normas nacionales e internacionales que involucren a los laboratorios de ensayo, asociada a los requisitos de gestión.
- Requerimientos técnicos que competen directamente a los laboratorios de diagnóstico de peces y moluscos.
- Realidad de los laboratorios nacionales, relacionada con los requisitos técnicos. Este punto incluye las funciones y deberes de un laboratorio de referencia como organismo fiscalizador de los laboratorios nacionales acreditados.

4.2.3.1. Normas nacionales e internacionales relacionadas con los Laboratorios de Diagnóstico

La acreditación es un proceso muy complejo porque parte desde una organización reconocida por el estado, la cual debe conocer todas las normas de carácter internacional. En el caso chileno, el gobierno ha delegado en el Instituto de Nacional de Normalización la autoridad para estudiar y preparar las normas técnicas a nivel nacional, esta organización es, además, miembro de la *International Organization for Standardization* (ISO) y de la de la Comisión Panamericana de Normas Técnicas (COPANT) representando a Chile ante esos organismos.

La producción de estándares reconocidos internacionalmente, tales como el International Standard ISO/IEC 17025 y el incremento en la aplicación en los laboratorios de las series de calidad total ISO/IEC 9000, facilita que los laboratorios tengan un sistema de calidad total apropiado, visible y uniforme. Esto se logra mediante la acreditación del laboratorio en cuestión ante un organismo competente.

A pesar que Chile cuenta con normas de acreditación de laboratorios de ensayo para distintos tipos de análisis, en el caso del diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos no existen normas de acreditación específicas para estos laboratorios.

Las normas se refieren, en general, a la competencia de laboratorios de ensayo y calibración aparecida recientemente en la norma ISO 17.025 de 1999, relacionada con los requisitos de gestión y revisadas en el curso de Implementación de ISO 17025 en laboratorios de ensayo INN, 2001, válida para cualquier tipo de laboratorio de ensayo (alimento, químico, mecánico, etc.).

Como consecuencia del crecimiento de la actividad acuícola, la existencia de laboratorios dedicados al diagnóstico de enfermedades de estos organismos ha ido en aumento. Hasta el momento, los procedimientos empleados por estos se basan en las indicaciones aparecidas en los manuales internacionales disponibles para el diagnóstico; no obstante, es necesario estandarizar los procedimientos de diagnóstico, en base a criterios como precisión y exactitud, practicidad y disponibilidad de los métodos, y, a su vez, contar con un sistema de acreditación de los laboratorios que realizan este tipo de análisis. Para este efecto, es necesario proponer un programa que contemple todos los requerimientos para optar a una acreditación reconocida tanto

por el o los organismos nacionales autorizados, como por los organismos internacionales relacionados.

El sistema a proponer, que tiene como objetivo regular y armonizar el nivel técnico de los laboratorios mediante reglamentaciones comunes, deberá tener sus propias reglas de procedimiento y gestión para efectuar la acreditación y ser supervisada por un organismo que dirija y administre el sistema y otorgue la acreditación.

La estrategia para conseguirlo es a través de la garantía de calidad y mediante la aplicación de buenas prácticas de laboratorio con una política y una gestión de calidad, siendo una condición básica la elaboración, uso y gestión adecuada de un Manual de Calidad.

Por lo tanto, para acreditar un laboratorio es necesario implementar un programa de garantía de calidad, el cual comprenda auditorías destinadas a revisar la eficacia del control de calidad. Control y evaluación adecuados aseguran la calidad.

Un segundo aspecto consiste en tener la seguridad que los resultados que se están produciendo son correctos, para esto se pueden elaborar programas sistemáticos de análisis de muestras de composición conocida, cuyo propósito es evaluar si el desempeño del laboratorio se mantiene en un nivel aceptable. Esto se lleva a cabo mediante ensayos intra e inter laboratorios.

En relación con las prácticas apropiadas del laboratorio, es importante la confiabilidad, asegurando la validez de los resultados de los análisis que realiza, además de brindar confianza a los clientes y promover la aceptación de los resultados de análisis, sin que sea necesario repetirlos. Estas características contribuyen a aumentar la credibilidad y promover las buenas prácticas de laboratorio, incentivando, además, el apoyo e intercambio entre los laboratorios acreditados. Todo esto facilita el comercio internacional a través de acciones de reconocimiento mutuo.

Tomando en cuenta que el principal objetivo de un laboratorio de ensayo es producir resultados fiables y de alta calidad, ésta es la actividad que debe recibir mayor atención. La garantía de calidad de los resultados constituye uno de los elementos fundamentales de administración para el director y su personal. Objetivo de calidad puede definirse como la seguridad, en la medida de lo posible, de haber obtenido una respuesta aproximadamente correcta, de forma tal que, de ocurrir cualquier error, éste no afecte la integridad, probidad o

competencia técnica del personal del laboratorio. La garantía de calidad centra la atención en los aspectos pertinentes de las actividades diarias y las necesidades de capacitación y ayuda al personal a mejorar su conocimiento y promover su carrera (FAO, 1992).

La garantía de calidad requiere de un sistema planeado de actividades, cuya finalidad consiste en proporcionar un producto de calidad. En este caso, el producto final es un diagnóstico.

4.2.3.2. Requerimientos técnicos asociados a los Laboratorios de Diagnóstico

Teniendo en cuenta lo anterior, es claro que un programa de garantía de calidad presenta ventajas tales como:

- Proporciona un registro de seguimiento que garantiza la integridad de la muestra con documentación para verificar que los instrumentos de laboratorio funcionan adecuadamente y que los datos de laboratorio se producen según los procedimientos aprobados.
- Ahorra tiempo y costos a largo plazo.
- Contribuye a identificar las necesidades de capacitación y/o actualización de los analistas.
- Crea una mayor confianza de los técnicos analistas al asegurarse que sus resultados son confiables, lo que redundará en el rendimiento.
- Tiene la seguridad que los errores se reducen al mínimo o se eliminan.
- Proporciona la garantía de credibilidad forense, respaldo de la administración del propio laboratorio.
- Garantiza la existencia de registros que se conservan por mucho tiempo y que permiten resolver casos en situaciones de litigio.
- Permite la realización de un examen de deficiencias, errores o reclamaciones, para tomar en forma sistemática medidas correctoras con las consiguientes mejoras intrínsecas.

- Permite optimizar los recursos del laboratorio a medida que se va acumulando información sobre el rendimiento analítico del laboratorio.

Además, proporciona beneficios indirectos tales como tener una buena imagen, confianza de los usuarios/clientes, eliminar repeticiones innecesarias, racionalizar el trabajo, minimizar la indecisión y promover las buenas prácticas del laboratorio, entre otros.

Para que un programa de garantía de calidad funcione, cada componente del sistema debe tener claras sus responsabilidades, por lo tanto, debe establecerse, en primer lugar, una estructura organizacional bien definida. Además, debe existir el fuerte compromiso de la institución, ya que el establecimiento de un programa de garantía de calidad significa apoyar plenamente su aplicación, lo que muchas veces se traduce en mayores costos al poner en marcha un programa de esta naturaleza.

Por lo tanto, para conseguir un diagnóstico de calidad, es necesario fijar una serie de requisitos técnicos a los laboratorios que los emiten. Es así que, teniendo en cuenta los criterios para la acreditación de un laboratorio, indicados por la Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.), (Acevedo, 1993), se desprende que los laboratorios deberán tener una infraestructura mínima, personal calificado (Recursos Humanos), y las condiciones para entregar un diagnóstico preciso, evitando la subjetividad en la interpretación de resultados. La estandarización de las condiciones de trabajo es especialmente importante tratándose de microorganismos, dada su susceptibilidad ante pequeños cambios ambientales, considerando además, que los resultados de una técnica varían ampliamente dependiendo de las condiciones en que ésta se realiza. Un procedimiento estandarizado evitará esta variabilidad, disminuyendo así las posibles discrepancias de resultados entre laboratorios.

Parte de las actividades básicas a desarrollar para dar inicio a una evaluación de los Laboratorios de Diagnóstico en el país, es la de conocer los recursos humanos con que cuenta, su infraestructura y campo de acción.

En relación a los recursos humanos, se debe tomar en cuenta, al menos, los siguientes aspectos:

- a) **Personal:** Cada laboratorio deberá tener un número mínimo de personal, de acuerdo con las funciones y especialización.

- b) **Nivel de especialización:** El personal deberá tener una especialización compatible con las funciones asignadas.
- c) **Experiencia:** Será deseable contar con personal experimentado en el campo de acción del laboratorio.
- d) **Investigación:** Será deseable la participación del laboratorio en proyectos de investigación y publicaciones relativas al tema.
- e) **Actualización:** El personal deberá estar al tanto de los últimos adelantos en el área del diagnóstico de enfermedades de peces y/o moluscos.

Respecto a la infraestructura, se debe considerar aspectos tales como:

- a) **Equipamiento:** El laboratorio debe poseer un equipamiento mínimo de acuerdo al tipo y función que realiza.
- b) **Espacio físico:** Será deseable la disponibilidad de áreas separadas, dependiendo del tipo y función del laboratorio. En este sentido, se podrían considerar las siguientes áreas:
 - Necropsia
 - Microscopía
 - Histología
 - Cultivos celulares
 - Biología molecular
 - Lavado y esterilización
 - Procesamiento general (mesones de trabajo, preparación medios y reactivos, etc.)
 - Oficinas, otros a evaluar

Al considerar el campo de acción se debe evaluar:

- a) Tipo de especie examinada (peces o moluscos).
- b) Especialización por patógeno (bacterias, virus, etc.) y otros a evaluar.

4.2.3.3. Realidad de los Laboratorios de Diagnóstico nacionales, relacionada con los requerimientos técnicos

Para conocer el grado de cumplimiento de los requisitos mínimos y establecer la competencia de los Laboratorios Nacionales de Diagnóstico de enfermedades de salmónidos, se consideró la información pertinente recopilada a través de las encuestas efectuadas a estos laboratorios, la cual se presenta en los siguientes cuadros resumen.

Recursos Humanos:

- *Personal:*

En este aspecto, se consideró las variables número de profesionales por laboratorio y grado de experiencia de los mismos (Cuadro N°30), como también el número de administrativos (Cuadro N°31).

Cuadro N°30: Laboratorios por Profesionales y Técnicos que trabajan en él

CANTIDAD DE PROFESIONALES y TECNICOS	Nº de Laboratorios
1	4
2	3
4 a 6	4
8	2
9 o más	2
Total	15

Cuadro N°31: Laboratorios por Personal Administrativo que trabaja en él

CANTIDAD DE ADMINISTRATIVOS	Nº de Laboratorios
0	2
1	5
2	2
3	3
Sin información	3
Total	15

En el Cuadro N°30 se debe destacar a 4 laboratorios con un alto número de profesionales especializados, los cuales coinciden con aquellos laboratorios que reciben la mayor demanda de servicios de diagnóstico. El Cuadro N°31, por otra parte, muestra que los Laboratorios, en general, cuentan con un número reducido de personal administrativo.

- *Especialización y Experiencia del personal*

Cuadro N°32: Profesionales y Técnicos de los Laboratorios y su experiencia en el área, por Profesión.

PROFESIÓN	N° de personas	Tiempo de experiencia (años)
Biólogo Marino	2	0,5
Bioquímico	10	6,1
Ingeniero Agrónomo	1	6
Ingeniero en Acuicultura	2	2 a 5
Médico Veterinario	20	1 a 13
Microbiólogo	1	14
Químico Marino	1	1
Técnico	2	3
Técnico Acuícola	2	0,5 a 1
Técnico Agrícola	1	0,5
Técnico Ambiental	2	2
Técnico Microbiólogo	3	0,2 a 10
Tecnólogo	2	1 a 3
Tecnólogo médico	13	0,5 a 12
Otros	3	0,2 a 1
Sin información	1	9

El Cuadro N°32 permite apreciar que las áreas de estudio de los profesionales que trabajan en los Laboratorios de Diagnóstico es bastante variada y que, salvo excepciones, poseen relativamente poco tiempo de experiencia en cuanto a diagnóstico.

- *Investigación*

De los Laboratorios de Servicios consultados, nueve manifiestan evidente preocupación por la actualización de su personal, puesto que además de estar apoyando el perfeccionamiento de sus profesionales, el Laboratorio ha participado en proyectos de Investigación. Además de estos Laboratorios, otros cinco también están apoyando la asistencia de su personal a actividades de perfeccionamiento. En contraposición, dos Laboratorios no desarrollan actividades de Investigación y/o Perfeccionamiento.

- *Actualización (Especialización por Patógeno)*

De acuerdo a lo especificado en los Cuadros N°20 al 23 del Objetivo 4.2, el Cuadro N° 33, presenta las principales técnicas de diagnóstico usadas por los laboratorios chilenos. Esto permite apreciar un alto grado de actualización de los laboratorios, puesto que estas técnicas son aquellas aceptadas y recomendadas internacionalmente.

Cuadro N°33: Técnicas de Diagnóstico más usadas por los Laboratorios chilenos, por Patógeno

PATÓGENO	TÉCNICAS UTILIZADAS
Virus	Inmunofluorescencia ELISA Aislamiento en líneas celulares PCR
Bacterias	Pruebas Bioquímicas Inmunofluorescencia ELISA
Parásitos	Microscopía óptica PCR
Hongos	Microscopía óptica

Infraestructura:

- *Equipamiento:*

En el Cuadro N°34 se puede constatar que la mayoría de los Laboratorios de Diagnóstico posee tecnología de punta y capacidad de realización de análisis complejos.

Cuadro N°34: Laboratorios de Servicio, según equipamiento que posee para el diagnóstico de enfermedades

EQUIPAMIENTO	N° de Laboratorios	%
Autoclave	13	81,3
Balanza analítica	6	37,5
Balanza precisión	14	87,5
Baño termoregulable (Baño María)	9	56,3
Cámara de flujo laminar vertical	6	37,5
Cámara polaroid	3	18,8
Cámara de flujo laminar horizontal	8	50,0
Centrífuga refrigerada	11	68,8
Centrífuga común	10	62,5
Centrífuga de plancton	2	12,5
Centrífuga de Ependorff	9	56,3
Aparato de electroforesis horizontal	3	18,8
Aparato de electroforesis vertical	5	31,3
Aparato de western blot	1	6,3
Destilador	11	68,8
Freezer	13	81,3
Horno Pasteur (estufa esterilización)	8	50,0
Incubador	8	50,0
Incubador de temperatura controlada	11	68,8
Lector de ELISA	9	56,3
Microscopio de contraste de fase	5	31,3
Microscopio de epifluorescencia	14	87,5
Microscopio electrónico	1	6,3
Microscopio estereoscópico (lupa)	4	2,5
Microscopio invertido	7	43,8
Microscopio óptico	12	75,0
Micrótopo	2	12,5
Phmetro	10	62,5
Refrigerador	14	87,5
Termociclador	6	37,5
Transiluminador	4	2,5
Espectrofotómetro	3	18,8
Micropipetas ajustables	12	75,0
Agitador magnético	10	62,5
Homogenizador de tejidos	3	18,8
Vortex	9	56,3

- *Espacio Físico:*

Respecto a la planta física de la que disponen los laboratorios para la realización de las diferentes técnicas, el Cuadro N°35 muestra que la mayoría (66,7%) posee 5 o más salas, lo cual estaría indicando que al menos 10 laboratorios cuentan con áreas de trabajo especializadas.

Cuadro N°35: Laboratorios de Servicio, por cantidad de salas que poseen

N° SALAS	N° de Laboratorios
1	2
2	1
3	1
4	1
5	3
6	5
7	0
8 o más	2

De acuerdo a lo emanado de la consulta técnica, se pudo observar que entre los laboratorios nacionales de diagnóstico que prestan servicio a la industria salmonera, existe preocupación por el tema de la acreditación y varios de ellos ya han iniciado el proceso de acreditación bajo normas ISO 17.025 y la serie 9000 ante el INN. Aquellos laboratorios que ya han iniciado su proceso de acreditación, que corresponden a los más equipados y que, además, tienen una demanda amplia por parte de los productores de salmónes, no necesitarían ser guiados para lograr la acreditación bajo estándares internacionales.

Una propuesta de acreditación bajo los objetivos de este proyecto, sólo debiera incluir a los laboratorios que mostraron menor nivel de desarrollo y a aquellos que se incorporarán a la oferta de servicios para la industria salmonera. Para este fin se propone una categorización de laboratorios la que debiera ser una etapa intermedia para que todos accedan finalmente a una acreditación internacional. Esta etapa intermedia se ha propuesto para permitir que todos los laboratorios de servicio estén regulados bajo un sistema de acreditación. Estos tendrían requerimientos mínimos de nivel intermedio en cuanto a personal, espacio físico y equipamientos.

4.3. Proposición de requerimientos mínimos para optar a la acreditación

4.3.1. Clasificación de los Laboratorios de Diagnóstico

Tomando en cuenta el nivel de desarrollo de los laboratorios de diagnóstico, se propone que los laboratorios chilenos sean agrupados en categorías, previo a la acreditación internacional, y que sean regulados por un organismo nacional competente. En tanto, los laboratorios más completos deberán optar a una acreditación en forma directa siguiendo la NCh ISO 17.025.

Los laboratorios reúnen ciertas características de estructura y personal que les permiten realizar algunas de las técnicas descritas anteriormente y, de acuerdo a la profundidad del diagnóstico efectuado y a su función, se pueden clasificar en tres clases:

- Laboratorios clase I:

Son aquellos cuyo papel primordial es auxiliar al clínico en el diagnóstico primario de una enfermedad infectocontagiosa, especialmente en sectores geográficos donde las condiciones tecnológicas no sean del todo favorables. Este hecho es importante en áreas como las propias de cultivo de especies hidrobiológicas, que por la distancia a los grandes centros urbanos, no siempre tienen buenas condiciones de trabajo.

Esta clase está esencialmente constituida por pequeños laboratorios de patología clínica o por pequeños laboratorios montados en los centros de cultivo. Estos laboratorios, pieza fundamental en el diagnóstico, participan como los responsables en la orientación adecuada de la colecta de un determinado material y como ejecutores de una de las etapas primordiales del procesamiento de laboratorio, que es la observación microscópica. De esta forma, los laboratorios de clase I, normalmente están restringidos a liberar diagnósticos microscópicos presuntivos de un determinado agente patógeno. Tales laboratorios deben poseer alguna forma de vínculo con un laboratorio clase II o III, para ser auxiliados en diagnósticos para los cuales la simple observación microscópica del material clínico no sea suficiente para orientar al profesional en su conducta terapéutica.

- **Laboratorios clase II:**

Están generalmente vinculados a empresas de gran tamaño o a ciertos laboratorios privados que poseen material, equipamientos y personal adecuados para la realización de cultivos e identificación de la mayor parte de los patógenos de organismos acuáticos. Estos laboratorios contribuyen de forma fundamental en la orientación a la toma de muestras, en el conocimiento de la microbiota de una determinada población y en la caracterización de los principales agentes patógenos para la población a la que sirve. Estos laboratorios pueden tener condiciones de efectuar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, cuando sean solicitados por el clínico.

A pesar de realizar un gran número de procedimientos de diagnóstico, los profesionales de estos laboratorios deben tener siempre en mente que la identificación no siempre es tarea simple y por eso deben mantener vínculos estrechos con laboratorios de clase III.

- **Laboratorios clase III:**

Son laboratorios especializados, pudiendo dedicarse más profundamente al estudio de los agentes. Además, tienen la responsabilidad de formar personal calificado para el área, evaluar eficiencia de medios de cultivo, técnicas y reactivos, organizar metodologías de control de calidad, proporcionar consejos técnicos y por último, desarrollar nuevas metodologías diagnósticas.

De esta manera, los laboratorios clase III están normalmente vinculados a centros de investigación (Universidades, Fundaciones, etc.) ofreciendo tanto a los de las clases I y II como a los profesionales que vengan a consultarlos, subsidios tecnológicos y mano de obra calificada para el auxilio final de un diagnóstico. Estos laboratorios podrían optar a funcionar como laboratorios de referencia al cumplir ciertos requisitos.

En función a los medios disponibles (equipamientos, profesionales calificados, etc.) los responsables por cada laboratorio establecen las funciones para las cuales éste es más adecuado, determinando el tipo de establecimiento que será generado (Clase I, II o III).

4.3.2. Espacio físico

Las características de espacio físico son bastante variables, dependiendo del tipo de laboratorio que se tiene en mente. La instalación y funcionamiento de un laboratorio clase I, básicamente destinado a la realización de exámenes microscópicos directos y/o tinciones, exige, fundamentalmente, el área física suficiente para la ubicación y uso de un microscopio. Por lo tanto, un pequeño mesón, parte de una mesa o incluso de un escritorio, que permita la acomodación adecuada del microscopio y el profesional pueden ser satisfactorias. Instalaciones equivalentes a éstas suelen ser encontradas en centros de cultivo. En tales casos, no suele existir una área separada para la colecta de muestras, siendo esta actividad adaptada a las condiciones de cada espacio físico.

Un laboratorio de clase II debe estar compuesto, por lo menos, de cuatro áreas diferentes: una destinada al recibimiento del material, registro y entrega de resultados (secretaría), otra exclusiva para la confección de medios de cultivo, una tercera para los trabajos de laboratorio propiamente tales y la última para el descarte del material contaminado y esterilización.

En los laboratorios clase III, son observadas instalaciones tales como sector de necropsia, preparación de medios de cultivo, secretaría, biblioteca y sala de estudios, laboratorio de ejecución de procedimientos propiamente dichos, con disponibilidad de espacio para equipamientos utilizados en la rutina (estufa, cámara de flujo laminar, etc.) y espacios para otros aparatos usados en investigación (Electroforesis, termociclador, etc.).

Las áreas de laboratorio, en general, deben obedecer a principios básicos, tales como: las paredes deben ser revestidas de material de color claro (Blanco o beige), deben ser de fácil limpieza, incluso lavables (azulejo, pintura al óleo, fórmica, etc.); los mesones donde serán ejecutadas las actividades de laboratorio también deben ser revestidas de material impermeable (acero inoxidable, fórmica o azulejo); la iluminación debe ser de buena calidad y con características que imiten la luz del día (lámparas fluorescentes).

El laboratorio debe poseer un número razonable de lavatorios, equipados con jabón, de preferencia líquido y toallas desechables, a fin de facilitar la realización de ciertas técnicas (tales como tinciones) y estimular la práctica de lavar las manos.

Las corrientes de aire deben circular desde áreas de bajo riesgo de contaminación hacia las de mayor riesgo y nunca al contrario. El aire que circula por el laboratorio, debe ser eliminado hacia el exterior.

Las cámaras de flujo laminar son equipamientos destinados a proteger al personal de laboratorio en la manipulación de material potencialmente dañino y en ciertas circunstancias, para proteger también a la muestra de contaminación externa. Las cámaras son subdivididas en tres clases, las de clase 1 permiten que el aire ambiente, no estéril, quede en contacto con la muestra, sin embargo este aire es filtrado y sale estéril desde dentro de la cámara. Las cámaras clase 2 esterilizan por filtración, tanto el aire que entra en contacto con el material como el que sale de la cámara y, finalmente, las de clase 3 son herméticamente cerradas, trabajando con aire estéril y presión negativa, este tipo de cámara es la que ofrece mayor seguridad al personal de laboratorio. Sin embargo, para todos los laboratorios de este estudio es suficiente una cámara clase 2.

Debe prestarse atención al sistema de ventilación del laboratorio, si es realizado por medio de ventanas, estas deben estar estratégicamente ubicadas en relación a las corrientes de aire locales, evitando la circulación inadecuada y la entrada de insectos voladores al laboratorio.

4.3.3. Material permanente

Se entiende por material permanente al conjunto de bienes materiales presentes en un laboratorio, con vida media de algunos años de uso. Así, instrumentos como estufas, microscopios y cámaras de flujo laminar entre otros, son considerados como permanentes.

Las necesidades de materiales permanentes varían dependiendo de la clase en que el laboratorio se encuadre, así en laboratorios clase I, lo principal e indispensable de material permanente es el microscopio binocular.

Como los laboratorios clase II son los que realizarán la mayor parte de los diagnósticos de enfermedades en organismos acuáticos de cultivo, el equipamiento necesario para su funcionamiento se lista en el Cuadro N° 36.

Cuadro N°36: Equipamiento mínimo necesarios para un Laboratorio Clase II .

MATERIAL PERMANENTE	CARACTERÍSTICAS BÁSICAS
Autoclave	100-135° C
Incubador	20-50° C
Refrigerador	-4 a 6° C
Freezer (congelador)	0 a 20° C
Microscopio	Binocular 1000x
Centrífuga	1500 a 4000rpm
Bañomaria	30 a 100° C
Cámara de flujo	Clase 2
Horno microondas	amplia capacidad

4.3.4. Material fungible

En la ejecución de las técnicas de laboratorio se utiliza gran cantidad de materiales desechables o con un índice de reaprovechamiento muy bajo. Los materiales fungibles son normalmente utilizados una vez para una finalidad básica (exceptuando la vidriería). En el Cuadro N°37 se lista el material fungible indispensable, del cual debe disponer un Laboratorio Clase II.

Cuadro N° 37: Material fungible básico para un Laboratorios Clase II

MATERIAL
Material de vidrio: <ul style="list-style-type: none">- Tubos de ensayo- Matraces- Placas Petri- Portas y cubreobjetos- Vasos de precipitados, etc.
Medios de cultivo <ul style="list-style-type: none">- Para microorganismos (bacterias, hongos)- De células
Microplacas de cultivo
Botellas de cultivo de células
Líneas celulares

4.3.5. Funcionamiento

Compete a la dirección del laboratorio establecer al menos, las siguientes normas básicas de funcionamiento:

- El laboratorio debe funcionar en una jornada normal de trabajo, no necesitando en general, de turnos u horas extras; en ciertas circunstancias, el material puede ser colectado en un determinado momento y guardado para posterior procesamiento.
- Debe ser formalmente prohibido fumar, alimentarse, beber cualquier líquido en cualquier área del laboratorio.
- Crear horarios de intervalo durante las dos jornadas para cualquier necesidad de los funcionarios.
- Prohibir depositar artículos personales sobre los mesones o demás estructuras del laboratorio.
- La utilización del delantal es obligatoria.
- Para el procesamiento de muestras clínicas, usar guantes, los cuales deben ser desechados después del uso, no siendo permitido realizar otras actividades como atender el teléfono o abrir puertas con los guantes puestos.
- Cualquier incidente de mayor o menor gravedad, ej. Errores en el procesamiento de la muestra, debe ser comunicado de inmediato a la dirección del laboratorio.
- Orientar a los profesionales técnicos sobre el inconveniente de mantener cabellos largos y sueltos en el ambiente de laboratorio.
- Debe prevenirse la formación de reactivos volátiles, orientando a los técnicos para no realizar movimientos bruscos durante el procesamiento del material clínico.
- El mechero debe ser colocado siempre entre el material procesado y el técnico.
- Los tubos de gas deben ser acondicionados en espacio fuera del laboratorio.
- Pipetear material usando pipeteador automático o “pera” de goma.
- No atribuir la exclusividad de una función sólo a un técnico de laboratorio, pues, en su falta, otro profesional deberá estar capacitado a efectuar la tarea.
- El acceso al laboratorio debe ser controlado, no permitiéndose la libre circulación de personas extrañas.

- Visitantes y nuevos funcionarios deben ser orientados desde los primeros instantes sobre las normas básicas del laboratorio.
- Establecer un programa de control de calidad revisando sus actividades básicas, involucrando en este programa a todos los profesionales del laboratorio.

4.3.6. Seguridad en el laboratorio

La seguridad del laboratorio va desde las medidas padrones utilizadas en el procesamiento de las muestras, hasta la utilización de equipamientos e instalaciones, a fin de evitar accidentes. El conjunto de esas medidas debe estar por escrito y estar disponible a los profesionales del área. Deben ser usadas cámaras de flujo laminar (cámaras de seguridad) siempre que un procedimiento técnico presente la posibilidad de formar aerosoles.

- Agujas y jeringas deben ser usadas lo menos posible, sólo cuando no existen otras opciones.
- Eliminar objetos punzantes y cortantes en recipientes adecuados, con un desinfectante químico (como formalina).
- Funcionarios con lesiones de piel deben evitar manipular material contaminado.
- El uso de barreras físicas debe ser practicado para prevenir la exposición de piel y mucosas.
- En el sector de confección de reactivos y medios de cultivo, debe existir una ducha de fácil acceso, para uso en caso de contacto de sustancias químicas con la piel.
- Extintores de incendio deben ser dispuestos en puntos estratégicos, para un rápido acceso en caso de urgencia, debiendo monitorearse la carga mensualmente.
- Equipamientos contaminados con fluidos orgánicos deben ser descontaminados antes del envío para reparaciones.

Finalmente, se hace notar que la medida principal en el combate de accidentes de trabajo está en la educación de los profesionales en cuanto a los riesgos en la manipulación de los materiales clínicos, en el conocimiento de las normas básicas y de las medidas utilizadas para prevenir infecciones en el ambiente del laboratorio.

4.4. Laboratorios de Referencia

Desde el punto de vista de las regulaciones internacionales, se hace necesaria la existencia de al menos un laboratorio de referencia para la región. Este laboratorio, tal como ocurre en los diferentes países miembros de la OIE, tiene por misión cumplir con el Programa de Vigilancia Epidemiológica Nacional, tendiente a evitar la introducción y diseminación de las enfermedades de alto riesgo para el país en cuestión, y deben ser dependientes del Estado.

La información entregada a continuación, corresponde en parte a la recopilación de antecedentes a través de publicaciones y reglamentaciones propuestas por la OIE y a lo observado durante la visita realizada al Laboratorio de Referencia CEFAS (Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science) en Weymouth, Inglaterra

4.4.1. Funciones y deberes de un Laboratorio de Referencia

- De acuerdo a la OIE, los Laboratorios de Referencia deben tener como principal mandato:
- Actuar como un centro de desarrollo y estandarización de las técnicas relevantes para el campo de su especialización, en la o las diferentes disciplinas del diagnóstico de las enfermedades de los animales acuáticos.
 - Almacenar y distribuir productos biológicos usados como referencia y de cualquier otro reactivo usado para el diagnóstico y control de las enfermedades especificadas en las Categorías I y II.
 - Desarrollar nuevos procedimientos para el diagnóstico y control de estas enfermedades.
 - Recopilar, procesar, analizar y distribuir información epidemiológica relevante a su especialización.
 - Los expertos que laboran en estos Laboratorios de Referencia deberán estar dispuestos a colaborar con la Oficina Internacional de Epizootias (OIE).

Además de lo anterior, los Laboratorios de Referencia deben contribuir a:

- Coordinar estudios científicos y técnicos en colaboración con otros laboratorios u organizaciones.
- Tipificar y almacenar las cepas de los patógenos de las enfermedades relevantes para el país, para realizar los tests serológicos y para la preparación de los antisueros.
- Abastecer a los laboratorios de diagnósticos con los reactivos y sueros estandarizados, para así estandarizar las pruebas diagnósticas.
- Construir y mantener una colección de las cepas y aislados de los patógenos relevantes para el país (cepario).
- Organizar periódicamente tests para comparar los procedimientos de diagnósticos utilizados por los laboratorios de diagnósticos nacionales.
- Reunir y cotejar datos e información acerca de los métodos de diagnósticos utilizados y de los resultados de los tests realizados por los laboratorios de diagnóstico nacionales.
- Elaborar una caracterización de los aislados de patógenos de las enfermedades relevantes para el país, utilizando los métodos vigentes y más apropiados para permitir una mayor comprensión de la epizootiología de la enfermedad.
- Mantenerse al día en los temas de vigilancia, epizootiología y prevención de las enfermedades relevantes a nivel mundial.
- Reunir, procesar, analizar y distribuir información epizootiológica relevante a su especialidad, entre los demás laboratorios de diagnóstico.
- Mantenerse al día en el conocimiento de los patógenos causales de enfermedades relevantes, además de los otros patógenos no relevantes, permitiendo así realizar un diagnóstico diferencial rápido.
- Adquirir un conocimiento cabal sobre la preparación y uso de los productos veterinarios utilizados para controlar y erradicar las enfermedades relevantes.
- Mantenerse al día en los nuevos procedimientos de diagnóstico y de control de las enfermedades relevantes especificadas en las Categorías I y II.
- Informar inmediatamente a la autoridad oficial en el caso que el laboratorio obtenga un diagnóstico positivo de alguna de las enfermedades reportables (Categorías I y II).

- Proveer de adiestramiento científico y técnico a los laboratorios nacionales, tanto privados como estatales, con la misión de armonizar las técnicas de diagnóstico utilizadas por todos los involucrados en el tema.
- Cooperar activamente en el diagnóstico de brotes de las enfermedades relevantes, recibiendo muestras de los aislados de los patógenos para la confirmación del diagnóstico, caracterización y estudios epizooticos.
- Emitir informes técnicos anuales acerca de las actividades realizadas en el año, incluyendo información acerca de: los catastros y diagnósticos realizados (base de datos); perfeccionamiento y entrenamiento de profesionales en el área; recepción de material para diagnóstico; desarrollo de métodos alternativos de diagnóstico; detalle de los reactivos y del material para diagnóstico proporcionado por el laboratorio, etc.

De acuerdo a lo establecido por la OIE, los laboratorios de referencia deben realizar inspecciones sanitarias periódicas a todos los centros de cultivos, tomando muestras para diagnosticar la presencia o ausencia de las enfermedades listadas en la Clase I. Estos catastros en la mayoría de los países miembros de la OIE, no tienen costo para los productores, son financiados por el Estado, quien tiene la misión de velar por la situación sanitaria del país.

4.4.2. Obligaciones y deberes de un Laboratorio de Diagnóstico Acreditado frente a un Laboratorio de Referencia

- Los laboratorios privados y los centros de cultivos tienen la obligación de declarar ante el Laboratorio de Referencia Nacional cuando se está en presencia de una enfermedad considerada de alto riesgo para el país, independientemente de los catastros periódicos que sean llevado a cabo por el Laboratorio de Referencia.
- Los laboratorios deben tener una infraestructura mínima y personal calificado, de acuerdo a su especialidad.
- La estandarización de las condiciones de trabajo es especialmente importante tratándose de microorganismos, dada su susceptibilidad ante pequeños cambios ambientales, considerando además, que los resultados de una técnica varían grandemente dependiendo

de las condiciones en que ésta se realiza. Un procedimiento estandarizado evitará esta variabilidad, disminuyendo así las posibles discrepancias de resultados entre laboratorios.

4.4.3. Actividades específicas que realiza el Laboratorio de Referencia CEFAS

Con la finalidad de lograr un mayor conocimiento acerca de las labores que desempeñan los laboratorios de referencia de la OIE, en Septiembre del 2001 se realizó una visita al Laboratorio de Referencia CEFAS, lo cual permitió conocer a fondo los deberes y obligaciones que debe cumplir un Laboratorio de este tipo, además de obtener información acerca de las técnicas de diagnóstico, equipamiento, características de los profesionales y distribución espacial de los diferentes departamentos que conforman ese laboratorio.

Este laboratorio es dependiente del Estado y, además de lo señalado en los puntos anteriores, tiene por misión realizar los catastros sanitarios a todos los centros de cultivos de peces y de moluscos existentes en Inglaterra, para lo cual cuenta con un laboratorio completamente equipado para el diagnóstico de las patologías virales, bacterianas y parasitarias. Cuenta con un equipo de 8 inspectores encargados de tomar las muestras en los centros de cultivos, coordinados por un inspector jefe. Estos inspectores además de tomar las muestras, están encargados de recopilar la información acerca de la situación sanitaria y productiva de cada plantel, lo cual forma parte de la base de datos que maneja el laboratorio. La información contenida en la base de datos permite conocer la distribución y zonificación de los centros de cultivos y de cada una de las patologías presentes en el país.

El Laboratorio CEFAS programa los muestreos durante dos temporadas al año: dos meses en primavera y dos meses en otoño, épocas en las que existe la mayor probabilidad de manifestación de enfermedades.

Siguiendo los protocolos delineados por la OIE, el laboratorio realiza las inspecciones sanitarias para los centros de cultivos nuevos, sin historial epidemiológico, dos veces al año, mientras que las inspecciones para los centros de cultivos declarados libres de las enfermedades de alto riesgo, de acuerdo a los muestreos semestrales realizados durante los dos primeros años, son realizadas cada dos años.

La toma de muestra está dirigida a ejemplares anómalos, moribundos, los cuales deben completar un número de 30 ejemplares por plantel, independiente del número de lotes, número y tamaño de los peces.

Las muestras son semiprocesadas en terreno y derivadas al laboratorio para su procesamiento. La toma de muestra siempre está enfocada a la detección de las enfermedades definida en el programa de vigilancia, por lo general a las enfermedades categorizadas en la Clase I. Las muestras son ingresadas con una clave, de tal forma asegurar la objetividad e imparcialidad en el diagnóstico.

**ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS,
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Técnicas de Diagnóstico:

La disponibilidad de técnicas para el diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos es amplia y variada. Los métodos de diagnóstico vigentes incluyen desde las técnicas más comunes y tradicionales, preferentemente usadas para diagnóstico presunto, hasta las más avanzadas y de alta sensibilidad, como son algunas pruebas inmunológicas y, últimamente, las técnicas moleculares, empleadas para diagnósticos confirmatorios. El avance en estas materias ha sido gracias a la investigación para el desarrollo de técnicas cada vez más específicas y sensibles para su utilización en medicina humana.

Entre los laboratorios de diagnóstico del país existe una preocupación permanente, tanto por actualizar las técnicas, como por adoptar rápidamente las nuevas metodologías, lo que los hace mantenerse al día en el uso de la llamadas “técnicas de punta”. Esto se explica, en parte, por la gran competitividad que se da en esta actividad, y porque los laboratorios nacionales son abastecidos por laboratorios de empresas internacionales, especialmente por proveedores de kits de diagnóstico interesados en que sus compradores implementen las nuevas técnicas. También se debe tener en cuenta que, en gran medida, obedece a que el producto de la actividad de cultivos se comercializa preferentemente en el ámbito internacional. En este último aspecto, es importante para el país y para los productores que los laboratorios de diagnóstico empleen las técnicas y procedimientos recomendados a nivel internacional.

A pesar de lo anterior, en la actualidad no existe en el país una uniformidad de criterios ni pautas claras de funcionamiento de los laboratorios. Es preciso llegar a una estandarización de las técnicas y protocolos en uso, desarrollar un sistema de abastecimiento de reactivos estándares, establecer la obligatoriedad de una calibración periódica de los instrumentos, etc., carencias que actualmente dificultan la comparación de los resultados de los análisis entre laboratorios de diagnóstico.

De acuerdo a la información recopilada y a la realidad nacional, los laboratorios de diagnósticos en Chile son todos privados y su función principal es la de prestar servicios a la industria salmonera para mantener bajo control las enfermedades presentes en el país. Para esto, los laboratorios están equipados con tecnología de punta, la cual asegura la entrega de diagnósticos rápidos y confiables, de tal forma que los productores tomen decisiones productivas en torno a las enfermedades que afectan a sus plantales de peces. Los procedimientos y técnicas empleadas, aún cuando se adaptan a lo recomendado por la OIE, no necesariamente están ajustadas a lo recomendado por este organismo internacional. Al no existir un ente regulador que controle y supervise el funcionamiento de estos laboratorios, no existe una estandarización de los protocolos ni de las técnicas de diagnóstico para la detección de una determinada enfermedad, la que será dependiente de los recursos y experiencia de cada laboratorio.

Es función de un Laboratorio de Referencia Nacional, desarrollar los procesos para la validación y estandarización de los métodos de diagnóstico, así como mantener un sistema de abastecimiento de los laboratorios de diagnóstico con los reactivos y sueros estandarizados.

En Chile, si bien existe una diversidad de laboratorios con diferentes características en tamaño y equipamiento, existe una relativa uniformidad en los métodos empleados, ya que en general todos emplean los métodos recomendados por la OIE, esto se nota, por ejemplo, en que todos tienen implementado el método IFAT.

Actualmente, según los resultados de la consulta aplicada a los laboratorios de diagnóstico de organismos acuáticos, las técnicas empleadas por cada uno de los laboratorios nacionales que respondieron el cuestionario, son elegidas dependiendo del objetivo que se persigue. Así, para fines de monitoreo o vigilancia, para el caso de bacterias comunes se emplean pruebas bioquímicas identificatorias, en tanto de diagnóstico para *Renibacterium salmoninarum* y *Piscirickettsia salmonis* se emplea IFAT. Si el objetivo perseguido es la identificación de un patógeno durante un brote de la enfermedad, se eligen pruebas adicionales tales como las histológicas, microscopía electrónica y otras, confirmando con las pruebas moleculares disponibles.

A modo de comparación, el análisis de las técnicas de diagnóstico que se usan en Chile se ha hecho en base a cuatro enfermedades importantes, ISA, IPN, BKD y SRS, usando como base de discusión las técnicas recomendadas por O.I.E., en tanto que técnicas para diagnóstico de otras

enfermedades importantes como Flavobacteriosis, Furunculosis y Yersiniosis están de acuerdo a los estándares recomendados por otros manuales de procedimientos como el *Blue Book*, Manual de Berger y otras publicaciones referidas a agentes específicos.

Se hace un paralelo para la comparación de técnicas recomendadas por la OIE y las utilizadas por los laboratorios en Chile para ISA, IPN, BKD y SRS.

Diagnósticos ISA:	OIE	Chile
Presunto	Histología (descubrimientos) Hematología (descubrimientos) Aislación en cultivo celular línea SHK-1	Aislación en cultivo celular línea SHK-1
Confirmatorio	Prueba IFAT con uso de Mab PCR	Confirmación fuera del país

Debido a que la presencia de ISA es de reciente confirmación en el país (Kibenge et al., 2001), no se han implementado los métodos confirmatorios, debiendo realizarse estas pruebas en el extranjero. Por otro lado, la línea celular SHK-1 para la aislamiento del patógeno es aún de difícil adquisición por los laboratorios nacionales.

Diagnósticos IPN:	OIE	Chile
Presunto	Aislación en cultivo celular línea BF-2 o CHSE-214 más efecto citopático (ECP) característico.	Aislación en cultivo celular línea CHSE-214 más efecto citopático (ECP) característico.
Confirmatorio	Pruebas de neutralización a placas con ECP. Prueba IFAT a monocapas celulares con el virus . Prueba ELISA a microplacas preparadas con Ig específico usando anticuerpos mono- clonales o policlonales. IFAT y ELISA directos.	Prueba IFAT directos a frotis renales. Prueba IFAT a aislados en en cultivo celular. Kit ELISA. Kit IFAT. PCR (uso de Kit).

En el caso de IPN, el método PCR no se encuentra entre las técnicas recomendadas por la OIE, sin embargo entre los laboratorios nacionales esta técnica molecular es de alta aceptación por su sensibilidad y rapidez.

El uso de técnicas moleculares en diagnóstico ha estado en discusión en la comunidad de científicos y lentamente se ha ido incorporando para la detección de algunos patógenos de peces.

Uno de los puntos en discusión está motivado por su alta sensibilidad la que conduce a detectar secuencias de ADN de microorganismos no patógenos activos, como por ejemplo ácido nucleico residual de patógenos muertos o fragmentos de ADN provenientes de organismos similares al agente, interpretándose como positivos algunos casos, sin que el pez sea portador del agente.

Las técnicas moleculares son útiles para la obtención de información sobre el agente infeccioso, pero para ser aceptadas con fines de manejo sanitario o regulación de poblaciones de peces, sus procedimientos deberán ser validados (Lapatra, 1998).

BiosChile provee de los Kits de diagnóstico para la detección de IPN, a través de un ELISA de captura (ELISA-PCR) y un Kit de IFAT. Entre los laboratorios nacionales, de acuerdo a las respuestas al cuestionario aplicado en este proyecto, el más usado es el Kit para IFAT.

Existe también oferta de otros proveedores de Kits para realizar los análisis de IPN, como por ejemplo DiagXotics que ofrece Kits ELISA para análisis de campo y de laboratorio.

Diagnósticos BKD:	O.I.E.	Chile
Presunto	Aislación en KDM-2 KDM-C y SKDM, más caracterización bioquímica.	Tinción Gram a frotis renales . Aislamiento en KDM-C.
Confirmatorio	Prueba de la aglutinación en portaobjetos. Inmunofluorescencia ELISA PCR	Pruebas inmunológicas directas al tejido (IFAT). Uso de Kits: IFAT, ELISA,PCR PCR

BKD es una de las enfermedades que cuenta con mayor disponibilidad de técnicas para su detección debido a que es una de las primeras enfermedades infecciosas descubiertas en el país, lo que ha permitido un mayor entrenamiento para detectarla precozmente.

A pesar de esto, los laboratorios desarrollan investigación aplicada para mejorar los métodos de detección.

Diagnósticos SRS:	O.I.E.	Chile
Presunto	Aislación en cultivo celular líneas CHSE-214 o EPC. Tinción Giemsa a sobrenadantes de cultivos celulares.	Tinción Giemsa o Acridina-Orange directa a frotis.
Confirmatorio	IFAT a crecimientos en líneas celulares. IFAT a frotis de tejido. Inmunohistoquímica PCR (nested) PCR (directo)	Kit IFAT IFAT Kit ELISA Kit PCR

Como diagnóstico presunto para la Piscirickettsiosis, la O.I.E. recomienda la aislación en cultivos celulares en las líneas CHSE-214 y EPC, y la tinción Giemsa aplicada a frotis de sobrenadante de cultivo celular con efecto citopático característico de esta enfermedad.

De acuerdo a las respuestas de los laboratorios nacionales, el diagnóstico presunto se realiza por lo general en base a tinción Giemsa de frotis de tejidos. Sin embargo, en la respuesta de un laboratorio se incluía el uso de la tinción Acridina-Orange. Esta técnica tuvo una gran aceptación cuando apareció en el mercado, sin embargo en la actualidad no parece ser de uso común. A pesar que esta tinción presenta algunas ventajas sobre la técnica Giemsa, como es la de producir un mayor contraste con el material del fondo de la preparación que permite detectar las bacterias aún cuando estén en baja concentración, sólo un laboratorio de los que respondieron la encuesta reconoció usarla en la detección de *Piscirickettsia salmonis*. Podría considerarse como desventajas de esta técnica el mayor número de pasos que requiere su aplicación y el uso de microscopio de epifluorescencia para la observación de los frotis, lo que requiere de personal

entrenado adecuadamente. Esta técnica no forma parte de las técnicas recomendadas por la O.I.E. para el diagnóstico presunto de *P. salmonis*.

A pesar de la disponibilidad del Kit ELISA, en las encuestas esta técnica aparece mencionada por sólo unos pocos laboratorios, prefiriendo la técnica IFAT tanto en Kit como la desarrollada por los propios laboratorios.

Para esta enfermedad, al igual que en el caso de BKD, existe gran disponibilidad de técnicas para su diagnóstico, debido al gran interés que ha concitado desde su aparición asociado al impacto en la producción. En tiempos recientes, se ha desarrollado mucha investigación tanto para su diagnóstico como para su prevención. Por esta razón, los laboratorios de servicio se mantienen al día en este aspecto.

Por otra parte, las técnicas de preferencia para la detección de *Flavobacteria*, *Aeromonas* y *Yersinia* por los laboratorios de servicio nacionales son las bioquímicas, a través de las pruebas bioquímicas en miniatura API System.

No se realizan pruebas inmunológicas a excepción de un laboratorio que declara utilizarla para el caso de diferenciar *Aeromonas salmonicida* atípica, realizando el ensayo de la aglutinación en portaobjetos

Resulta adecuado emplear sólo esta prueba, puesto que la caracterización bioquímica llega a individualizar el género con certeza y una probabilidad menor para la especie. El problema estaría en la detección precoz de la enfermedad que no podría ser detectada a través del crecimiento de un inóculo en medios de cultivo. Esta prueba requiere que la bacteria esté presente en cierto número en el órgano muestreado para que sea detectada por este medio. Y si el objetivo no es la detección de portadores ni conocer la etapa temprana, no hay razón para aplicar métodos de detección más sensibles.

Una razón puede estar dada por el hecho que los cultivadores se encuentran más predispuestos frente a brotes de patógenos no controlables con terapias, como son los virus y bacterias intracelulares, que frente a aquellas enfermedades provocadas por patógenos que tienen métodos de control y prevención efectivos. Resulta entonces de mayor relevancia, para los cultivadores, detectar cuando los lotes de cultivo se infectan y cual es la prevalencia de la infección, para así tomar las medidas de resguardo de la producción.

Desde el punto de vista del productor, una enfermedad bacteriana con medidas de conocidas, no reviste mayor problema ya que existiendo la medicación adecuada, ésta llevará a la recuperación del buen estado de salud del plantel. Diferente debe ser la posición de un organismo de vigilancia estatal, el cual debiera estar interesado en la erradicación y control de toda enfermedad, evitando el uso indiscriminado de antibióticos, práctica que puede llegar a ser muy nociva para el ambiente. Un buen sistema de vigilancia deberá llegar a la identificación específica de todos los brotes infecciosos que generen algún problema en los cultivos de organismos acuáticos, de manera de hacer un seguimiento de ellos y mantener la información disponible para todos los involucrados.

Las técnicas más utilizada en la actualidad para realizar una identificación confirmatoria son aquellas basadas en procedimientos inmunológicos; sin embargo, el avance de la ciencia en el desarrollo de procedimientos moleculares para una variedad de patógenos, permite ir reemplazando las técnicas inmunológicas por las moleculares, que tienen la ventaja de no necesitar el crecimiento de los organismos patógenos, situación que es necesaria para muchos patógenos que no crecen en medios convencionales o bien tienen un crecimiento lento.

Estandarización de técnicas

Es imposible unificar los protocolos hasta ahora empleados por los laboratorios nacionales, debido a la reserva de los mismos para señalar los procedimientos que emplean en los diagnósticos.

Es por esta razón que hasta no contar con un laboratorio de referencia dependiente del estado, es conveniente mantener como procedimientos estándares aquellos señalados por el Manual OIE, para las enfermedades que en él se indican y convenir en el uso de los procedimientos que aparecen en el Manual *Blue Book* que contiene los procedimientos estándares para los laboratorios de USA, además de los procedimientos publicados en revistas de difusión científica, para aquellas enfermedades que no se mencionan en los manuales citados.

Equipamiento e infraestructura

Respecto del equipamiento de los laboratorios, éstos en general están adecuadamente equipados para desarrollar las técnicas que usan y cuentan con áreas de trabajo especializadas.

En la actualidad la mayoría de los laboratorios están cambiando y adaptando su infraestructura y equipos para cumplir con las normas ISO 17.025 para laboratorios de ensayo y calibración, a fin de optar a la acreditación a través de Instituto Nacional de Normalización (INN).

CONCLUSIONES

- En general todos los laboratorios, y en especial los laboratorios que realizan la mayor parte de las asesorías a la empresa acuícola en relación al diagnóstico de enfermedades infecciosas, están empleando técnicas de punta y los procedimientos recomendados por O.I.E..
- No hay en el país laboratorios de servicios para el diagnóstico de enfermedades de moluscos. Sólo algunos laboratorios de investigación desarrollan estudios en patógenos de estos organismos.
- A pesar que los laboratorios nacionales emplean técnicas de punta, es difícil comparar los protocolos de las técnicas recomendadas por O.I.E. con las aplicadas en Chile, debido a que los laboratorios nacionales tienen grandes reservas al momento de señalar los procedimientos que emplean en los diagnósticos; pero analizando la información por ellos entregada, es posible tener una idea a nivel general de los protocolos empleados.
- Un laboratorio de referencia dependiente del estado vendría a unificar inequívocamente los procedimientos de los laboratorios que pretendan ser acreditados en este sistema.
- Los laboratorios de diagnóstico privados están motivados para lograr la acreditación por parte del INN. Para esto, han realizado mejoras y modificaciones de la distribución de sus dependencias, han implementado los criterios de calibración de los equipos y se encuentran desarrollando e implementando los protocolos de procedimientos para cada una de las actividades y técnicas desarrolladas. Esto les permitirá poder cumplir fácilmente con los requerimientos que les imponga un Laboratorio de Referencia.
- El Laboratorio de Referencia para Peces puede actuar en forma independiente al Laboratorio de Moluscos, aún cuando hay países en los cuales ambos laboratorios funcionan bajo una misma institución, como en el caso del CEFAS (U.K). Sin embargo, en países como Noruega, el sistema es diferente, existiendo Laboratorios Regionales (estatales) coordinados por un Laboratorio Central estatal.

RECOMENDACIONES

Se estima conveniente mantener como procedimientos estándares aquellos señalados por el Manual O.I.E. para las enfermedades que en él se indican y convenir en el uso de los procedimientos que aparecen en el Manual *Blue Book* que contiene los procedimientos estandarizados para los laboratorios de diagnóstico en Estados Unidos, además de los procedimientos publicados en revistas de difusión científica, para aquellas enfermedades que no se mencionan en los citados manuales.

Con el fin que los resultados de los análisis de diagnóstico de enfermedades sea comparable entre laboratorios, se hace necesario que el país cuente con un organismo autorizado, es decir un Laboratorio de Referencia Nacional, una de cuyas misiones sea la de actuar como un centro de desarrollo y estandarización de las técnicas relevantes para el diagnóstico de las enfermedades de animales acuáticos. Este laboratorio, tal como ocurre en la mayoría de los países en los que la acuicultura es una actividad económica importante, debe ser financiado por el Estado y dependiente de él, de tal forma que se logre la imparcialidad deseada.

Es deseable que todos los laboratorios de servicio logren la acreditación, por esta razón es necesario que los que aún no han dado inicio al proceso de acreditación, lo inicien en el corto plazo.

Los laboratorios de referencia darán el respaldo necesario a los resultados de los análisis obtenidos en los laboratorios acreditados y, por lo tanto, sometidos a todo tipo de regularización y fiscalización de sus actividades y procedimientos. De esta manera, los resultados de los análisis realizados en los laboratorios nacionales serán equivalentes y de acuerdo a estándares internacionales.

La confianza en los resultados generados en los laboratorios de diagnóstico acreditados, tendrá una directa relación con el nivel de confianza en el laboratorio de referencia nacional, el cual proveerá de los reactivos necesarios para los ensayos, el entrenamiento al personal encargado de efectuar los mismos y la supervisión de los procedimientos en auditorías sistemáticas, de acuerdo a las pautas designadas.

El laboratorio de referencia, tanto para salmónidos como para moluscos, deberá comenzar a funcionar en el corto plazo y de a poco podrá ir adaptando los procedimientos a los requerimientos propios de la realidad nacional, de manera de ir validando los métodos y entregando información útil para los laboratorios que trabajan en este ámbito. Además, tendrá la importante función de uniformar las técnicas autorizadas dentro del país y los equipamientos adecuados para la realización de las mismas. Hasta el momento, esta situación ha estado relativamente ausente de la realidad chilena porque los diferentes laboratorios desarrollan las técnicas que estiman más adecuadas y los resultados están de acuerdo a las limitaciones de cada método empleado.

Para Chile se debe buscar la mejor combinación en lo referente a la estructura y ubicación geográfica de los Laboratorios de Referencia de Peces y Moluscos, de tal forma de asegurar que el Laboratorio de Referencia tenga el nivel técnico y profesional que logre el reconocimiento y aceptación por parte de los laboratorios privados, cuya única función es la de entregar un servicio de diagnóstico. En cambio, un Laboratorio de Referencia, tiene como misión evitar la introducción y diseminación de enfermedades de alto riesgo al territorio nacional y entre las diferentes regiones.

Referencias bibliográficas

- Acevedo, A.L. 1994. Laboratorios Analíticos. Como garantizar la calidad. Ed. Universitaria. Chile. 159 p.
- Adams, S.; Morris, D. y Thompson, K. 2000. Pathogen Detection by PCR. Fish Farmer, March/April, 46-47.
- Austin, B. y Austin, D..A. 1991. Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. (eds. John Wiley & Sons). 317 pp.
- Barlough, J.E.; McDowell, T.S.; Milani, A.; Bigornia, L.; Slemenda, S.B.; Pieniasek, N.J. and R. P. Hedrick. 1995. Nested polymerase chain reaction for detection of *Enterocytozoon salmonis*, genomic DNA in Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Diseases of Aquatic Organisms Vol, 23:17-23.
- Blake, S.; Schill, W.B.; McAllister, P.E.; Lee, M.K.; Singer, J.T. and B.L. Nicholsosn. 1995. Detection and Identification of Aquatic Birnoviruses, by PCR Assay. Journal of Clinical Microbiology, 835-839.
- Bouchard, D.; Keleher, W.; Opiyz, H.M.; Blake, S.; Edwards, K. C. y Nicholson, B. L. 1999. Isolation of infectious salmon anemia virus (ISAV) from atlantic salmon in New Brunswick, Canada. Diseases of Aquatic Organismsm DAO 35:131-137
- Boudry, P., B. Chatain, Y. Naciri-Graven, C. Lemaire and Andrérard. 1996. Genetical improvement of marine fish and shellfish: a French perspective. Proceeding of FOID'96 5:141-150.
- Bower, S. M.; Blackbourn, J.; Meyer, G. R. y Welch D. W. 1999. Effect of *Perkinsus qugwadi* on various species and strains of scallops. Diseases of Aquatic Organisms DAO 36: 143-151.

- Bower, S.M. y McGladdery, S:E: 1997. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Table of Contents. Fisheries and Oceans Canada. Revised July 23, 1999.
- Bower, S. M.;Blackbourn, J.; Meyer, G.R. y Welch, D. W. 1999. Effect of *Perkinsus qugwadi* on various species and strains of scallops. Diseases of Aquatic Organisms DAO 36:143-151.
- Boxshall, G. A. y Bravo, S. 2000. On the identify of the common *Caligus* (Copépoda:Sephonostomatida:Caligidae) fom salmonid netpen systems in northern Chile. Contributions to Zoology: 69(1/2):137-146.
- Bravo, S. 2000. Occurrence of atypical furunculosis in Chile. Bull. Eur- Ass. Fish Pathol., 20 (5): 209-211
- Bravo, S. 1996. *Enterocytozoon salmonis* in Chile. FHS/AFS Newsletter. Vol. 24 (1): 12-13.
- Bravo, S. 1994. Piscirickettsiosis in fresh waters. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol, 14 (4) 137-138.
- Bravo, S. 1988 Registro de parásitos detectados en salmónidos de cultivo en la X Región. Boletín de Informaciones Actualizado Pfizer, Santiago.
- Bravo, S. y Campos, M. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. FHS/AFS Newsl. 17(3): 3
- Brousseau, D.J., J.C. Guedes, C.A. Lakatos, G.R. Lecleir and R.L. Pinsonneault. 1998. A comprehensive survey of Long Island Sound oysters for the presence of the para site, *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 17:255-258.
- Bucke, D. 1972. Histological Techniques applicable to fish tissues. In: Mawdesley-Thomas, L.E. (ed.). Diseases of fish Symp. Zool. Soc. London. N. 30, pp. 153-189.
- Bucke, D. 1988. Pathology of Bonamiasis. Parasitol. Today, 4: 174-176.
- Bucke D. 1991.Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. Chapter V: Histology. In: Austin y Austin (eds. John Wiley & Sons). 317 pp.
- Bustos P.; Calbuyahue. J.; Montaña, J.; Opazo, B.; Entrala, P. and R. Solervicens. 1995. First Isolation of *Flexibacter psychrophilus* as Causative Agent of Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS) Producing Rainbow Trout Mortality in Chile.

- Cáceres-Martínez, J., J.A.F. Robledo and A. Figueras. 1995. Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ría de Vigo, Galice (NW Spain). *Aquaculture* 130:15-23.
- Campalans, M.; González, M. y Rojas, P. 2000. Neoplasia In *Mytilus chilensis* Cultivated In Chiloe Island(Chile). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*,15(5):162-164.
- Campalans, M.; Rojas, P.; Sepúlveda, J.; Pascual, J.; Guerrero, I.; Riquelme, C. y Castro, R. 1997. Desarrollo de un Programa de Detección y Tratamiento de Enfermedades en Moluscos Cultivados en Chile. Proyecto FIP N°95-32/97.
- Campalans, M.; Rojas, P.; Sepúlveda, J.I.; Castro, R.; Guerrero I. y Pascual J. 1995. Programa de Vigilancia de Patologías de Salmonídeos Cultivados en la Zona Sur Austral. Informe Final Proyecto FIP 93-29. *Estud. Doc. Universidad Católica De Valparaíso.*08/95:96pp.
- Campalans, M.; Rojas, P. And Gonzalez, M. 2000. Haemocytic Parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 20(1):31-33.
- Carvajal, J. 1988. Patología de moluscos y repoblación. *Invest. Pesq. (Chile)* 35: 123-128.
- Compendio y Directorio Acuicultura y Pesca. 2001. *Aquanoticias*, VIII Versión, 413 p.
- Comps, M.; y Tigé, G.1999. Procaryotic infections in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and its parasite the turbellarian *Urastoma cyprinae*. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO 38:211-217
- Couch, J.A. y Fournie, J.W. 1993 (Editors). *Pathology of Marine and Estuarine Organisms. Advances in Fisheries Science.* 552 p.
- Culloty, S. C.; Novoa, B.; Pernas, M.; Longshaw, M.; Mulcahy, M. F.; Fiest, S. W. y A. Figueras. 1999. Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vector for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO 37:73-80.
- Cvitanich, J.; Gárate, O. y Smith, Ch. E. 1990. Etiological agent in a Chilean Coho Disease isolated and confirmed by Koch' s postulates. *Fish Health Section-American Fisheries Society*, Vol. 18, Number 1:1-7.
- Cvitanich, J.D.; Gárate, O.; Silva, C.; Andrade, M.; Figueroa, C. y Smith, J. D. 1995. Isolation of a New Rickettsia-Like Organism From Atlantic Salmon in Chile *FHS/AFS News* 123:1-3.
- Chavez, C. y Riquelme , S.C. 1994. Analisis of the bacteriological quality of *Argopecten purpuratus* breeders, for their use in aquaculture. *Rev. Latinoam Acuicult.* N° 43, pp: 96-99.

- Elston, R. A.; Frelter, O. y Cheney, D. 1999. Extrapallial abscesses associated with chronic bacterial infections in the intensively cultured juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms DAO 37:115-120.
- Elston, R. 1994. Diseases of shellfish. In: J.C. Thoesen (Editor), Suggested Procedures for the detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens. 4th Edition, version 1, Fish Health Section, American Fisheries Society.
- Ford, S.E. 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change?. Journal of Shellfish Research 15:45-56.
- Ford, S.,R. Smolowitz and M. Chintala. 2000^a. The question of temperature and *Perkinsus marinus* (Dermo) activity in the northeastern United States. Journal of Shellfish Research 19: 571 (Abstract).
- Ford, S.E., R. Smolowitz and M.M. Chintala. 2000^b. Temperature and range extension by *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 19: 598 (Abstract).
- Friedman, C.S.; J.H. Beattie, R.A. Elston and R.P. Hedrick, 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Thunberg. Aquaculture 94:1-15
- Fryer, J. L.; Lannan, C. N.; Giovannoni, S. J. y Wood, N.D. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of an Epizootic Disease in Salmonid Fishes. Inter. J. Sys. Bact. Vol. 42 (1): 120-126.
- Fryer, J. L.; Lannan, C. N.; Garcés, L.H.; Larenas, J.J. and Smith P.A. 1990. Isolation of a Rickettsiales-Like Organism From Diseased Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Chile, Fish Pathology ,25(2).107-114.
- Gaggero, A.; Castro, H. y Sandino, A.M. 1995. First Isolation of *Piscirickettsia salmonis* From Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) and Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), During the Fishwater Stage of Their Life Cycle. J. Fish Dis.18.
- Goede, R.W. 1989. Fish health/condition assessment procedures. Part I. Utah Division of Wildlife Resources. Citado en Blue Book, John C. Thoesen Editor. 1994.
- Goggin, C.L., And S.C. Barker. 1993. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal R.N.A., Molecular and Biochemical Parasitology 60:65-70.

- González, L. 1998. The life cycle of *Histerothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. *Aquaculture*, Vol 162 (3-4) 170-185.
- González, M.; Rojas, P. y Campalans, M. 1999. Anomalías Celulares en Larvas de Ostra Japonesa (*Crassostrea gigas*) Provenientes de Cultivo. *Invest. Mar.*, Valparaíso, 27: 111-114.
- Gray, A.P.; Lucas, I.A.N.; Seed, R. y Richardson, C.A. 1999. *Mytilus edulis chilensis* infested with *Coccomyxa parasítica* (Chlorococcales, Coccomyxaceae). *Journal of Molluscan Stud* vol. 65, n° 3, pp: 289-294.
- Hine, P.M. 1992. Ultrastructural and ultracytochemical observations on *Bonamia sp.* in oysters (*Tiostrea chilensis*) with a consideration of organella fuction. *Aquaculture* 107:175-183.
- House, M. L.; Bartholomew, J. L.; Winton, J. R. y Fryer, J. L. 1999. Relative virulence of three isolates of *Piscirickettsia salmonis* for coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO 35:107-113.
- Humason, G.L. 1979. *Animal tissue techniques*. Third edition. W.H. Freeman and Co. San Francisco USA. Citado en Blue Book, John C. Thoesen Editor, 1994.
- Illanes, J. 1986. Situación Actual del Cultivo del Ostión (*Argopecten purpurata*) y ostra (*Crassostrea gigas*) en el norte de Chile. En: P. Arana (Editor), *La Pesca en Chile*. Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 305- 314.
- Jaramillo, E.; Navarro, J. Y Winter, J. 1981. The Association Between *Mytilus chilensis* Hupe (Bivalvia, Mytilidae) and *Edotea magellanica* Cunningham (Isopoda, Valvífera) in Southern Chile. *BIOL., BULL., MAR. BIOL. LAB., WOODS HOLE*. Vol. 160, n°. 1, pp. 107-113.
- Kibenge, F. S B.; Gárate, O. N.; Jonson, G.; Arraigada. R.; Molly, J. T.; Kibenge, D. W. 2001. Isolation and identification of infectious salmon anemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO 45:9-18.
- Kibenge, F.S.B.; Whyte, S.K.; Hammell K. L.; Rainnie, D; Kibenge, M. T. y Martin, C. K. 2000. A dual infection of infectious salmon anemia (ISA) virus and a togavirus-like virus in ISA of Atlantic salmon *Salmo salar* in New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO: 42: 11-15.
- Kinne, O. (Ed.). 1983. *Diseases of Marine Animals*. Volume II. Biologische Anstalt Helgoland. Germany. 610 p.

- Kleeman, S. N. y Adlard, R.D. 2000. Molecular detection of *Marteila sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO: 40:137-146.
- Lapatra, S. 1998. The use of advanced technologies in aquatic animal health management. President`Report, FHS Newsletter Vol, 26 N° 4 (Oct., 1998).
- Levine, N.D. 1978. *Perkinsus* gen. N. And other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *The Journal of Parasitology* 64:549.
- Lovely, J. E.; Dannerig, B. H.; Falk, K.; Hutchin, L.; MacKinnon, A.M.; Melville, K. J.; Rimstad, E. y Griffiths, S.G. 1111. First identification of infectious salmon anemia virus in North America with haemorrhagic kidney syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO 35:145-148.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko., & Parker, J. 2000. *Clinical and Diagnostic Microbiology and Immunology*. In: Brock *Biology of Microorganisms*. 9ª Ed. Editorial Prentice-Hall do Brasil, Ltda. Rio de Janeiro.
- McAllister, P.E. y Reyes, X. 1984. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Isolation From Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson, Imported Into Chile. *J. Fish. Dis.* 7: 319-322.
- MacLean, D.G. 1971. A simplified procedure for detecting *Myxosoma cerebralis* (whirling disease) spores in large lots of fish. *The Progressive Fish-cultured* 33:203. Citado en *Blu Book*, Thoesen J.C. Editor. 1994.
- Mialhe, E.; Boulo, V; Bachere, E.; Hervio, D.; Cousin, K.; Noel, C.; Ohresser, M.; le Deuff, R. M.; Despres, B.; and Gendreau, S. 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusk and shrimp aquaculture. *Aquaculture*. 107:155-164.
- Mix, M.C. y Breese, W. P. 1980. A Cellular Proliferative Disorder in Oysters (*Ostrea chilensis*) from Chiloé, South America. *J. Inver. Pathol.* 36: 123-124.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashy, G.S. & Pfaller, M.A. 2000. *Principios generales de diagnóstico Laboratorial* En: *Microbiología Médica* 2000. 3º Ed. Editorial Guanabara/Koogan, Río de Janeiro.
- Norton, J.H., M.A. Sheperd, F.O. Perkins and H.C. Prior. 1993. Perkinsus-like infection in farmed golden-lipped pearl oyster *Pinctada maxima* from the Torres Strait, Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* 62:105-106.

- Novoa, B. y Figueras, A. 2000. Virus-like particles associated with mortalities of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*: DAO 39:147-149.
- Office International des Epizooties. 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Tercera edición, 153 pp.París Francia
- Office International des Epizooties. 2000. Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos. Tercera edición, París Francia. 206 p
- O'Grodnick, J.J. 1975. Whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) spore concentration using the continuous plankton centrifuge. *Journal of Wildlife Diseases*:11:54-57.
- Oliva, M.; Herrera, H.; Matulic, J. y Severino, B. 1986. Parasitismo en el ostión del norte *Chlamys purpuratus* (L) Parasit. Al día. 8: 83-86.
- Pauley , G.B., Chew, K.K. and Sparks, A.K. 1967. Experimental infection of oysters (*Crassostrea gigas*) with thigmotrichid ciliates. *Journal of Invertebrate Pathology*) 9:230-234.
- Perkins, F.O. 1996. The structure of *Perkinsus maximus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *Journal of Shellfish Research* 15:67-87-
- Reece, K.S., M.E. Shiddall, E.M. Burreson and J.E. Graves. 1997b. Phylogenetic analysis of *Perkinsus marinus* strains based on actin gene sequences. *The Journal of Parasitology* 83: 417-423.
- Referencia Electrónica, www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/sealane/aquac/pages/toc.htm Bower, S.M. y McGladdery, S:E: 1997. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Table of Contents. Fisheries and Oceans Canada. Revised July 23, 1999
- Renault, T. Y Lipart, C. 2001. A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*: DAO 45: 1-7.
- Renault, T.; Le Deuff, R.; Chollet, B.; Cochenec, N. y Gérard, A. 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO: 42: 173-183.
- Renault, T.; Stockes, N. A.; Chollet, B.; Cochenec, N.; Berthe, F.; Gerard, A.y Burreson, E. M. 2000. Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms* DAO: 42:207-214.

- Reyes, X. 1985. Biologie et Physiologie Animales Sciences et Techniques en Production Animale. Option: Ichtyologie Appliquée (Tesis Doctorado), L'Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
- Reyes, X.. 1983. Enfermedades infecto-contagiosas parasitarias de salmonidos de cultivo en Chile. En: Symposium Internacional de Acuicultura. Coquimbo. Chile.:407-422.
- Ritchie, R.J.; Cook, M.; Melville, K.; Somand, N.; Cusack, R.; Griffiths, S. 2001. Identification of infectious salmon anemia virus in Atlantic salmon from Nova Scotia (Canada): evidence for functional strain differences. Diseases of Aquatic Organisms DAO:44. n° 3, p:171-178.
- Riquelme, C.; Araya, R. y Escribano, R. 2000. Selective Incorporation of Bacteria by *Argopecten purpuratus* Larvae: Implications for the Use of Probiotics in Culturing Renau Systems of the Chilean Scallop.
- Riquelme, C.; Toranzo, A.E.; Barja, J.L.; Vergara,.; y Araya, R. 1996. J. Invertebr. Pathol. Vol 67, n°. 3, pp. 213-218.
- Riquelme, C., Hayashida, G.; Vergara, N.; Vasquez, A.; Morales, Y. y Chavez, P. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. Aquaculture 138: 49-60.
- Rojas, P.; Campalans, M. y González, M. 1999. Hemocytic Neoplasia in the Chilean oyster (*Tiostrea chilensis*) Cultured in the South of Chile. New Record. Inv. Mar., Valparaíso, 27: 15-18.
- Santos, C.H.C. & Silva, E.N. 2000. Métodos de Diagnósticos Laboratoriais Microbiológicos e sorológicos. In; Doenças das aves. Editado por Berchieri, A.J. & Macari, M. Fundação APINCO. Campinas SP.
- Servicio Nacional de Pesca. 1999. Anuario Estadístico de Pesca 1999. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. 291 p.
- Siddall, M.E., K.S. Reece, J.E. Graves and E.M. Burreson. 1997. "Total evidences refutes the inclusion of Perkinsus especies in the phylum Apicomplexa-Parasitology 115:165-176.
- Schlotfeldt, H-J. 1984. Prevención y Control Legal de epidemias de peces dulceacuícolas de interés económico, especialmente en el caso de países que inician actividades relacionadas con la acuicultura, enfoque comparativo de las principales legislaciones existentes al respecto. Mems Asoc. Latinoam. Acuicult., 5(3): 641-652.

- Sharif, S, R. y Prasad. P. 2000. Tools of Disease Diagnosis in Fish. Fish Farmer, Nov./Dec. 20-22.
- Sidrin, J.J.C. & Moreira, J.L.B. 1999. Estructuración de un laboratorio de micología. In: Fundamentos clínicos e laboratorais da micologia médica. Editorial Guanabara/Koogan S.A., Rio de Janeiro.
- Smith, P. A.; Pizarro, P.; Ojeda, P.; Contreras, J.; Oyanedel, S. y Larenas, J. 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms DAO 37:165-172.
- Snyder, B. 1971. Supplemental Report on Inland Freshwater Resources of Central Chile. UNDP/FAO. 35 pp.
- Staley, J.T.; Bryant, M.P.; Pfennig, N. and Holt, J.G. (eds.) 1989 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 3. The Williams and Wilkins Co. Baltimore
- Sunela, I.; Karolus, J.; Lang, E. P.; Mroczka, M. E.; y Volk, J. Diseases of Aquatic Organisms DAO: 42:153-155.
- Teuber, C.; Riffart, G.; Donoso, T.; Vial, M.V.; Gebauer, M.T. y Rohovec, J. 1990. Presencia y Capacidad Patogénica de *Vibrio anguillarum* (Canestrini) en Aguas del Sur de Chile. Medio Ambiente, 11 (1): 33-41.
- Thoesen, J.C. (Ed.). 1994. Blue Book. Versión 1. Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Fin fish and Shellfish Pathogens. Fourth Edition. Fish Health Section. American Fisheries Society.
- Toledo, M. S.; Troncoso, M.; Portell D: P. y Figueroa, G., 1992. Reporte de un brote de yersiniosis asociada a *Yersinia ruckeri* en salmónidos de cultivo. XV Congreso chileno de Microbiología, Valdivia, 9 al 12 de octubre, 1992.
- Vial, M.; Teuber, C. ; Costabal, P. ; Poblete T.; Donoso, T. & Gebauer, M. 1988. The presence of *Vibrio anguillarum* (Canestrini) in the digestive tract of *Mytilus chilensis* (Hupe). Biota, Vol. 4, nº 2, 119-124.
- Wesche, S. J.; Adlard, R. D. y Lester, R. J. G. 1999. Survival spores of the oyster pathogen *Marteilia sydneyi* (Protozoo, Paramyxia) as assessed using fluorogenic dyes. Diseases of Aquatic Organisms DAO 36: 221-226.

- Williams, K.; Blake, S.; Sweeney, A.; Singer, J. T. y Nicholson, B.L. 1999. Multiplex Reverse Transcriptase PCR Assay for Simultaneous Detection of Three Fish Viruses. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 37 (12): 4139-4141.
- Wood, W. J. 1970. Introducción del Salmón del Pacífico en Chile, Informe al Servicio Agrícola y Ganadero, División de Pesca y Caza. 8 pp.
- Wurmann, G. C. 2000. La acuicultura comercial chilena. Desafíos, oportunidades y metas hasta el 2020. *Aquanoticias*, nº 58, Noviembre.

ANEXO 1

**HISTORIA DE LOS REGISTROS DE ENFERMEDADES
DE SALMONIDOS Y MOLUSCOS EN CHILE**

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	2
1.- ENFERMEDADES DE SALMONIDOS CULTIVADOS EN EL PAIS	3
Cuadro A	3
Cuadro B	6
Cuadro C	7
2.- ENFERMEDADES DE MOLUSCOS CULTIVADOS EN EL PAIS	
Cuadro D	8
Cuadro E	10
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	12

INTRODUCCION

En el actual estado de desarrollo de los cultivos acuícolas nacionales, es necesario y oportuno contar con la información más completa y actualizada sobre los hallazgos de agentes causantes de enfermedades, realizados por laboratorios nacionales y extranjeros.

Las enfermedades que en la actualidad se presentan en dichos organismos acuáticos, han sido reportadas a través de diversos medios de difusión científica y tecnológica y, a partir de 1998, registradas por el programa de vigilancia epidemiológica desarrollado por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca), labor realizada fundamentalmente con los datos de información mensual enviados por los laboratorios de diagnóstico reconocidos por este servicio.

Esta información se refiere principalmente a peces salmónidos, puesto que la mayor parte de los laboratorios de diagnóstico están asesorando más estrechamente a esta industria.

Las enfermedades consignadas en documento, son de declaración obligada a la OIE y/o señaladas como peligrosas por la OIE. Además se incluyen algunas enfermedades que son de amplia distribución y poca selectividad de huéspedes, como *Vibrio spp.* o *V. anguillarum* (Teuber et al., 1990), que han sido reportadas en *Mytilus chilensis* y salmones coho, señalando en su estudio que serían cepas de baja capacidad patogénica.

1. ENFERMEDADES DE SALMÓNIDOS CULTIVADOS EN EL PAÍS

En Chile, el primer incidente documentado de enfermedades afectando a peces salmónidos, lo realizó Wood (1970), al registrar la presencia de 2 ó 3 parásitos y un par de enfermedades bacterianas en perca trucha, truchas y salmones. Wood detectó además, la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), peligrosa enfermedad característica de salmones, la que se diseminó desde Río Blanco (V Región), a las pisciculturas de Polcura y Lautaro y a otras zonas donde se liberaron peces sobrevivientes, constituyendo éste, el primer registro de introducción y diseminación de una enfermedad exótica (Snyder, 1971). Desde entonces, las enfermedades más importantes, registradas en publicaciones y que han tenido un serio efecto económico para la industria de cultivo de salmones, se listan en el **Cuadro A**, de acuerdo al orden de aparición.

Cuadro A : Primer registro de enfermedades de Salmónidos, de importancia Económica

Año de Aparición	ENFERMEDAD	Autor y Año de la publicación
1970	Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD). Causada por la bacteria <i>Renibacterium salmoninarum</i> .	Wood, 1970
1984	Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN).	Mc Allister y Reyes, 1984
1989	Septicemia rickettsial de salmones (SRS) Provocada por la bacteria <i>Piscirickettsia salmonis</i> .	Bravo & Campos, 1989.
1992	Enfermedad Entérica de la Boca Roja (ERMD) Provocada por la bacteria <i>Yersinia ruckeri</i> .	Toledo et al., 1992.
1993	Síndrome del Alevín de la Trucha Arcoiris Provocada por la bacteria <i>Flavobacter psychrophilus</i> .	Bustos et al., 1995.
1995	Microsporidiosis Causada por el microsporidio <i>Nucleospora salmonis</i> .	Bravo, 1996
1995	Furunculosis atípica. Causada por <i>Aeromonas salmonicida</i> atípica.	Bravo, 2000
2000	Mixosporidiosis Provocada por <i>Kudoa thyrsites</i>	Chacko et al., 2001

❖ Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD)

Desde el primer registro en Chile en truchas y salmones de cultivo, realizado por Wood (1970), esta patología se ha seguido diagnosticando en forma continua y se ha diseminado en la medida que ha crecido la distribución geográfica de las zonas de cultivo. En este caso, el esfuerzo del Estado y de los productores nacionales, ha estado dirigido a la prevención de esta enfermedad, aplicando medidas tendientes a la obtención de progenie libre de este patógeno, mediante el conocimiento de la condición sanitaria de los reproductores. Esta enfermedad se presenta tanto en agua dulce como en el mar.

❖ Piscirickettsiosis

Causada por un patógeno intracelular, fue reportada por primera vez por Bravo y Campos en 1989. En sus inicios fue reportada en salmón coho, en agua de mar, provocando mortalidades cercanas al 90%. Posteriormente se extendió a otras especies de salmónidos cultivados en Chile, salmón del Atlántico, salmón chinook y trucha arcoiris. Fryer et al., en 1990, aislaron un organismo tipo rickettsial desde salmón coho de agua de mar, el que posteriormente se identificó como *Piscirickettsia salmonis* (Fryer et al.1995).

Desde un comienzo, la enfermedad había sido descrita sólo en peces cultivados en agua de mar, hasta que Bravo (1994) la reporta por primera vez en truchas cultivadas en el Lago Llanquihue. Gaggero et al. (1995) publican un estudio en que dan cuenta de la primera aislación del agente en truchas y salmón coho de agua dulce. En la actualidad, la enfermedad está siendo controlada mediante métodos terapéuticos y preventivos.

❖ Necrosis Pancreática Infecciosa, IPN,

El virus causante de esta patología fue aislado por primera vez en Chile por Reyes y McAllister en 1984, en ejemplares de trucha arcoiris en agua dulce, lo que constituye el primer reporte para Sudamérica. Los autores sugieren que el virus VR-299 fue introducido en las ovas de un lote de trucha provenientes de Norteamérica. Posteriormente, en 1996, fue detectada esta misma cepa VR-299 en una piscicultura de la Región Metropolitana (Informes técnicos de laboratorio). A partir de 1998 se comienza a reportar en forma

frecuente la cepa europea Sp por los laboratorios adscritos al programa de vigilancia de Sernapesca, lo que demuestra su amplia distribución en los cuerpos de agua dulce y en mar.

❖ Flavobacteriosis (RTFS)

Síndrome del alevín de trucha arcoiris, cuya primera aislación fue reportada por Bustos et al. en 1995. Es una enfermedad de difícil control, especialmente en juveniles debido a que no responden a los tratamientos comunes con antibióticos. En la actualidad, es común observar reportes de *Flavobacterium psychrophylum* en los informes de los laboratorios adscritos al sistema de vigilancia de Sernapesca.

❖ Microsporidiosis

Patología causada por el microsporidio *Nucleospora salmonis*, fue reportada por Bravo en 1996 en los lagos Rupanco y Llanquihue, causando mortalidades de alrededor del 90%. Actualmente, esta enfermedad ha sido reportada frecuentemente por los laboratorios del sistema de vigilancia de Sernapesca. Se trata de una enfermedad de difícil o nulo control dada sus características de organismo intracelular.

❖ Furunculosis atípica,

Enfermedad de reciente aparición en el país, es considerada dentro de las enfermedades de importancia por tratarse de un problema creciente para la acuicultura en Chile, debido a las importantes pérdidas producidas en el cultivo del salmón del Atlántico. Una revisión realizada por Bravo en el 2000, indica que la enfermedad ha sido diagnosticada en Chile desde 1995 desde agua de mar, siendo endémica de áreas específicas.

Esta enfermedad es fácilmente controlada con antibióticos y en otros países se cuenta con vacunas comercialmente disponibles para su prevención.

Por otra parte, los patógenos que han sido reportados, desde el inicio del programa de vigilancia de patologías de organismos acuáticos impulsado por Sernapesca hasta la fecha, se listan en el **Cuadro B**. La mayoría de ellos se caracteriza por estar distribuidos en todas las áreas en donde se cultiva el salmón.

Cuadro B: Patógenos de salmónidos actualmente presentes en Chile registrados por Sernapesca

PATÓGENOS	ESPECIE HUÉSPED
<p><u>Bacterianos</u> <i>Renibacterium salmoninarum</i> <i>Piscirickettsia salmonis</i> <i>Flavobacterium spp.</i> <i>Flabobacterium columnare</i> <i>Flavobacterium psychrophilum</i> <i>Flexibacter maritimus</i> <i>Flavobacterium aqualitis</i> <i>Flavobacterium hutchinsonii</i> <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Vibrio spp</i> <i>Aeromonas spp.</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida atípica</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus spp</i> <i>Enterococcus sp.</i></p>	<p>Todos salmonidos O. mykiss, O. Kisutch, S. salar O. mykiss, O. Kisutch, S. Salar O. mykiss, S. Salar O. mykiss, O. Kisutch, S. Salar O. mykiss, O. Kisutch O. mykiss, S. Salar O. kisutch O. mykiss, O. Kisutch, S. Salar O. mykiss, O. Kisutch, S. Salar O.mykiss O. mykiss, S. Salar S.salar O. mykiss, S. Salar O.kisutch S. salar S.salar</p>
<p><u>Virales</u> Necrosis Pancreática Infecciosa (Leucosis linfloblastica</p>	<p>O. mykiss, O. Kisutch, S. salar O.kisutch</p>
<p><u>Protozoarios</u> <i>Ichtyobodo necatriz</i> <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> <i>Chilodonella spp.</i> <i>Hexamita spp.</i> <i>Microsporidium spp.</i> <i>Nucleospora salmonis</i> <i>Kudoa sp</i></p>	<p>S. salar S. salar S. salar O.mykiss, O. Kisutch O.mykiss Todos los salmónidos S.salar</p>
<p><u>Crustáceos</u> <i>Caligus spp</i> <i>Ergasilus sp.</i> <i>Cerathotoa</i></p>	<p>Todos los salmónidos S.salar S.salar</p>

Fuente: Programa de Vigilancia Epidemiológica en Acuicultura de Sernapesca (Informes Julio-Diciembre 1998, Enero-Junio 1999, Agosto-Diciembre 1999 y Enero-Junio 2000).

Cuadro C: Enfermedades de Salmónidos cultivados en Chile, registrados en publicaciones nacionales e internacionales, por Agente

AGENTE	ENFERMEDAD	REFERENCIA
VIRUS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) ➤ Necrosis Eritrocítica Viral (VEN) ➤ Anemia Infecciosa del Salmón (ISA) 	<p>McAllister & Reyes, 1984 Reyes & Campalans, 1987 Kibenge et al., 2001</p>
BACTERIAS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Renibacter salmoninarum</i> (BKD) ➤ <i>Piscirickettsia salmonis</i> (SRS) ➤ <i>Yersinia ruckeri</i> (ERM) ➤ <i>Flavobacter psychrophilus</i> (RTFS) ➤ <i>Aeromonas salmonicida</i> atípica ➤ <i>Aeromonas hydrophila</i> Septicemia por aeromonas móviles (MAS) ➤ <i>Flexibacter columnaris</i> (Columnaris) ➤ <i>Pseudomonas spp.</i> (Septicemia hemorrágica) 	<p>Wood, 1970 Bravo & Campos, 1989 Toledo et al., 1992 Bustos et al., 1995 Bravo, 2000</p> <p>Reyes, 1983</p> <p>Reyes, 1983 Reyes, 1983</p>
PROTOZOOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ➤ <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> ➤ <i>Trichodina</i> sp. ➤ ➤ <i>Chilodonella cyprini</i>. ➤ ➤ <i>Ichthyobodo necatrix</i> ➤ <i>Hexamita</i> sp. ➤ <i>Nucleospora salmonis</i> ➤ <i>Kudoa thyrsites</i>. 	<p>Bravo, 1987 Reyes, 1983 Bravo, 1987 Reyes, 1983 Bravo, 1987 Reyes, 1983 Bravo, 1987 Bravo, 1996 Chacko et al. 2001</p>
PARASITOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ergasilosis ➤ <i>Argulus</i> ➤ <i>Caligus</i> ➤ <i>Ceratomyxa gaudichaudii</i> ➤ <i>Hepatoxylon trichiuri</i> ➤ <i>Hysterothylacium aduncum</i> (Nematoda) 	<p>Reyes, 1983 Bravo 1987 Bravo, 1988 Reyes & Bravo, 1983 Bravo, 1988 Reyes, 1982 González, 1998</p>
HONGOS	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Saprolegnia</i> sp. 	<p>Reyes, 1983</p>

2. ENFERMEDADES DE MOLUSCOS EN CULTIVO EN EL PAÍS

En moluscos, el conocimiento de las enfermedades que afectan su cultivo está menos desarrollado que en el caso de los peces; en parte, esto se debe a que es un área poco estudiada en la medicina animal (Elston, 1994).

El primer reporte de enfermedad en moluscos en el país, aparece en la publicación de Mix & Breese (1980), donde se documenta la aparición del *desorden proliferativo celular* en ostras de Chiloé. Un listado de las enfermedades cuya aparición en Chile se ha publicado, se muestran en el **Cuadro D**.

Cuadro D : Primer registro de enfermedades de Moluscos, de importancia económica

Año de Aparición	ENFERMEDAD	Autor y Año de la publicación
1995	Trasmisión vertical de bacterias del género <i>Pseudomonas</i> Moraxelas y <i>Vibrios</i> en cultivos larvales de Ostión del Norte (<i>Argopecten purpuratus</i>).	Riquelme et al., 1995
1998	Neoplasia en <i>Mytilus chilensis</i> .	Campalans et al., 1998
1999	Neoplasia en <i>Tiostraea chilensis</i>	Rojas et al., 1999
1999	Anomalías celulares en larvas de <i>Cassostrea gigas</i> .	González et al., 1999
2000	Parasitosis hemocítica en ostra chilena	Campalans et al., 2000

El conocimiento de las enfermedades que afectan a los moluscos de cultivo está menos desarrollado que en el caso de los salmónidos. Los registros de parásitos en poblaciones naturales: Carvajal (1988), Oliva et al. (1986) y el reporte del *desorden proliferativo celular* en ostras de Chiloé realizado por Mix y Breese en 1980, dan inicio al conocimiento de los problemas sanitarios en moluscos de bancos naturales. Posteriormente, Riquelme et al. (1995) inicia la publicación de la investigación realizada en problemas bacterianos de los cultivos larvales del ostión del norte.

El primer estudio referido al estado sanitario de moluscos de cultivo que contempla larvas, juveniles y adultos, se realizó mediante el proyecto FIP 95/32 ejecutado por la Universidad Católica de Valparaíso y permitió conocer los problemas patológicos de siete especies de cultivo en la X región y una de la IV región del país. Para la detección de las anomalías se realizaron cortes histológicos, los cuales permitieron la observación de siete condiciones patológicas (Campalans et al. 1997). En la ostra chilena (*Tiostrea chilensis*) fueron detectados dos tipos de protozoos, uno en la glándula digestiva y el otro en manto, túbulos digestivos y branquias; ninguno de ellos provocaba reacción del huésped ni daño en células. En esta misma especie se registraron, además, otras dos anomalías, una señalada como proliferación anormal del tejido de glándula digestiva (neoplasia) y la otra correspondería a una alteración de los hemocitos, llamada parasitosis hemocítica; ninguna de ellas asociada a signos externos ni internos.

El ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) fue la única especie que presentó signos asociados a la condición descrita, tales como retracción del manto y destrucción de la valva. Se describe a un protozoo tipo *Ascetospora* como el causante de esta patología.

El chorito de cultivo (*Mytilus chilensis*) presentó dos anomalías, una de ellas descrita como neoplasia hemocítica afectando, a tejido digestivo y manto, y la otra se describe como una parasitosis hemocítica, afectando a células sanguíneas. En ninguna de estas dos anomalías los individuos afectados presentaron signos o mortalidades asociadas. También para esta especie se describe un protozoo dentro de las células epiteliales de los túbulos digestivos, aunque no se observó ningún daño atribuido al protozoo.

En la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) se observaron plasmodios semejantes a los que presentan los protozoos haplosporidios en células epiteliales de manto, branquias, glándula digestiva y gónadas. Tampoco fue posible asociar daño en las células o signos externos en los

individuos que presentaron esta condición. Las larvas de esta especie presentaron dos tipos de anomalías; una de ellas descrita como esferas gastrointestinales y la otra, como cuerpos electrodensos en las células ciliadas del velo.

Posteriormente, a partir de los descubrimientos de este primer catastro de enfermedades de moluscos de cultivo, fueron publicados los trabajos de la descripción de la neoplasia en *Mytilus chilensis* (Campalans et al., 1998) y en *Tiostrea chilensis* (Rojas et al., 1999), el trabajo de la descripción de las anomalías en ostra japonesa (González et al, 1999) y el trabajo sobre la parasitosis hemocítica en ostra chilena (Campalans et al., 2000).

Por otro lado, como se puede apreciar en Riquelme et al. (2000), los estudios de las bacterias en cultivo de larvas del ostión del norte han sido conducidos hacia la investigación de probióticos para mejorar la supervivencia de esta etapa del desarrollo del ostión.

Cuadro D : Enfermedades y agentes patógenos de moluscos cultivados en Chile, registrados en publicaciones nacionales e internacionales, por agente

Agente	Enfermedad	Referencia
BACTERIAS	➤ Pseudomonas, Moraxelas y Vibrios en cultivos larvales de Ostión del Norte	Riquelme <i>et al.</i> , 1995
	➤ Vibrios en <i>Argopecten purpuratus</i>	Chavez <i>et al.</i> , 1994.
	➤ <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> asociados a larvas de <i>Argopecten purpuratus</i>	Riquelme <i>et al.</i> , 1996
	➤ <i>Vibrio anguillarum</i> en tracto digestivo de <i>Mytilus chilensis</i>	Vial <i>et al.</i> , 1988
PROTOZOOS	➤ Parasitosis hemocítica (tipo <i>Bonamia</i>) en ostra chilena	Campalans <i>et al.</i> , 2000
PARASITOS	➤ <i>Edotea magellanica cunningham</i> (Isopoda Valvifera) en <i>Mytilus chilensis</i> .	Jaramillo <i>et al.</i> , 1981
	➤ Alga <i>Coccomyxa parasitica</i> en <i>Mytilus edulis chilensis</i>	Gray <i>et al.</i> , 1999

ORIGEN INCIERTO	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Neoplasia en <i>Tiostrea chilensis</i> ➤ Neoplasia en <i>Mytilus chilensis</i> ➤ Esferas gastrointestinales en larvas de <i>Crassostrea gigas</i>. ➤ Cuerpos electrodensos en velo de larvas de <i>Crassostrea gigas</i>. 	<p>Mix & Breese, 1980 Rojas <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Campalans <i>et al.</i>, 1998</p> <p>González <i>et al.</i>, 1999</p> <p>González <i>et al.</i>, 1999</p>
----------------------------	--	--

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bravo, S. 2000. Occurrence of atypical furunculosis in Chile. Bull. Eur- Ass. Fish Pathol., 20 (5): 209-211
- Bravo, S. 1996. *Enterocytozoon salmonis* in Chile. FHS/AFS Newsletter. Vol. 24 (1): 12-13.
- Bravo, S. 1994. Piscirickettsiosis in fresh waters. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14 (4) 137-138.
- Bravo, S. y Campos, M. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. FHS/AFS Newsl. 17(3): 3
- Bustos P.; Calbuyahue. J.; Montaña, J.; Opazo, B.; Entrala, P. and R. Solervicens. 1995. First Isolation of *Flexibacter psychrophilus* as Causative Agent of Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS) Producing Rainbow Trout Mortality in Chile.
- Campalans, M.; Rojas, P. And Gonzalez, M. 2000. Haemocytic Parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 20(1):31-33.
- Campalans, M.; González, M. and P. Rojas. 1998. Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Chiloé Island (Chile). Bull.Eur.Ass.Fish Pathol., 18(3):93
- Campalans, M.; Rojas, P.; Sepúlveda, J.; Pascual, J.; Guerrero, I.; Riquelme, C. y Castro, R. 1997. Desarrollo de un Programa de Detección y Tratamiento de Enfermedades en Moluscos Cultivados en Chile. Proyecto FIP N°95-3222/97.
- Carvajal, J. 1988. Patología de moluscos y repoblación. Invest. Pesq. (Chile) 35: 123-128.
- Chacko, A.J. G.L. Hoffman and S. Bravo. 2001. Kudoa Thyrsites (Myxozoa, Multivalvulida) detected in the muscles of farmed Atlantic Salmon from Chile. Abstract Book: International Conference EAAP 9-14 September, Dublin, Irlanda.
- Chavez, C. y Riquelme , S.C. 1994. Analisis of the bacteriological quality of *Argopecten purpuratus* breeders, for their use in aquaculture. Rev. Latinoam Acuicult. N° 43, pp: 96-99.
- Elston, R. 1994. Diseases of shellfish. In: J.C. Thoesen (Editor), Suggested Procedures for the detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens. 4th Edition, version 1, Fish Health Section, American Fisheries Society.

- Fryer, J.L.; Lannan, C.N.; Giovannoni, S.J. and D. Wood. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. Nov., sp. Nov., the Causative Agent of an Epizootic Disease in Salmonid Fishes International Journal of Systematic Bacteriology. Jan.p. 120-126.1
- Fryer, J. L.; Lannan, C. N.; Garcés, L.H.; Larenas, J.J. and Smith P.A. 1990. Isolation of a Rickettsiales-Like Organism From Diseased Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Chile, Fish Pathology ,25(2).107-114.
- Gaggero, A.; Castro, H. y Sandino, A.M. 1995. First Isolation of *Piscirickettsia salmonis* From Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) and Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), During the Fishwater Stage of Their Life Cycle. J. Fish Dis.18.
- González, M.; Rojas, P. y Campalans, M. 1999. Anomalías Celulares en Larvas de Ostra Japonesa (*Crassostrea gigas*) Provenientes de Cultivo. Invest. Mar., Valparaíso, 27: 111-114.
- Gonzalez, L. 1998. The life cycle of *Histerothylacium* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. Aquaculture, Vol 162(3-4):170-185.
- Gray, A.P.; Lucas, I.A.N.; Seed, R.. y Richardson, C.A. 1999. *Mytilus edulis chilensis* infested with *Coccomyxa parasítica* (Chlorococcales, Coccomyxaceae). Journal of Molluscan Stud vol. 65, n° 3, pp: 289-294.
- Jaramillo, E.; Navarro, J. Y Winter, J. 1981. The Association Between *Mytilus chilensis* Hupe (Bivalvia, Mytilidae) and *Edotea magellanica* Cunningham (Isopoda, Valvífera) in Southern Chile. BIOL., BULL., MAR. BIOL. LAB., WOODS HOLE. Vol. 160, n° 1, pp. 107-113.
- Kibenge, F. S B.; Gárate, O. N.; Jonson, G.; Arraigada. R.; Molly, J. T.; Kibenge, D. W. 2001. Isolation and identification of infectious salmon anemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. Diseases of Aquatic Organisms DAO 45:9-18.
- López, J. C. y J. Navarro. 2000. Descripción de casos clínicos producidos por nuevos tres agentes patógenos de importancia en salmones de cultivo, en Chile. XI Congreso de Medicina Vetrinaria, Universidad de Chile, Jornadas de Salmonicultura, Puerto Varas, Chile.

- McAllister, P.E. y Reyes, X. 1984. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Isolation From Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson, Imported Into Chile. J. Fish. Dis. 7: 319-322.
- Mix, M.C. y Breese, W. P. 1980. A Cellular Proliferative Disorder in Oysters (*Ostrea chilensis*) from Chiloé, South America. J. Inver. Pathol. 36: 123-124.
- Oliva, M.; Herrera, H.; Matulic, J. y Severino, B. 1986. Parasitismo en el ostión del norte *Chlamys purpuratus* (L) Parasit. Al día. 8: 83-86.
- Reyes, X. and M. Campalans. 1987. Necrosis Eritrocítica Viral (VEN) presunta en *Salmon coho* de la Décima Región, Chile. Invest. Mar., Valparaíso, 15:25-31.
- Reyes, X. 1985. Recherches sur les maladies des salmonides au Chili: Proposition d'une réclamation sanitaire. These Grade Docteur de Troisieme Cycle. L'Institute National Polytechnique de Toulouse, France.126 p.
- Reyes, X.. 1983. Enfermedades infecto-contagiosas parasitarias de salmonidos de cultivo en Chile. En: Symposium Internacional de Acuicultura. Coquimbo.Chile.407-422.
- Reyes, X. 1982. Presencia de *Hepatoxylon trichiure* (Holten, 1802) (Cestoda: *Trypanorhyncha*) en *Oncorhynchus tsachawytscha* y *Somnioosus pacificus* capturados en Chile. Invest. Mar., Valparaíso, 10(1-2):41-43.
- Riquelme, C.; Araya, R. y Escribano, R. 2000. Selective Incorporation of Bacteria by *Argopecten purpuratus* Larvae: Implications for the Use of Probiotics in Culturing Renau Systems of the Chilean Scallop.
- Riquelme, C.; Toranzo, A.E.; Barja, J.L.; Vergara,.; y Araya, R. 1996. Association Of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with Larval Mortalities of Scallop (*Argopecten purpuratus*) J. Invertebr. Pathol. Vol 67, N°3, pp. 213-218.
- Riquelme , C.; Hayashida, G.; Vergara, N.; Vasquez, A.; Morales, Y. y P. Chavez. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) cultured in Chile. Aquaculture 138:49-60.
- Rojas, P.; Campalans, M. y González, M. 1999. Hemocytic Neoplasia in the Chilean oyster (*Tiostrea chilensis*) Cultured in the South of Chile. New Record. Inv. Mar., Valparaíso, 27: 15-18.
- Snyder, B. 1971. Supplemental Report on Inland Freshwater Resources of Central Chile. UNDP/FAO. 35 pp.

- Teuber, C.; Riffart, G.; Donoso, T.; Vial, M .V.; Gebauer, M.T. y Rohovec, J. 1990. Presencia y Capacidad Patogénica de *Vibrio anguillarum* (Canestrini) en Aguas del Sur de Chile. *Medio Ambiente*, 11 (1): 33-41.
- Toledo, M. S.; Troncoso, M.; Portell D: P: y Figueroa, G., 1992. Reporte de un brote de yersiniosis asociada a *Yersinia ruckeri* en salmónidos de cultivo. XV Congreso Chileno de Microbiología, Valdivia, 9 al 12 de octubre, 1992.
- Vial, M.,; Teuber, C.; Costabal, P.; Poblete, T.; Donoso, T. & Gebauer, M. 1988. The presence of *Vibrio anguillarum* (Canestrini) in the digestive tract of *Mytilus chilensis* (Hupe) . *Biota*, Vol.4, N°2, 119-124.
- Wood, W. J. 1970. Introducción del Salmón del Pacífico en Chile, Informe al Servicio Agrícola y Ganadero



**Universidad Católica
de Valparaíso**

FIP 2001/09



**Universidad Austral
de Chile**

ANEXO II

FORMULARIOS ENCUESTAS



Encuesta a Laboratorios Nacionales de Servicios.

TECNICAS DE DIAGNOSTICO EN ENFERMEDADES DE SALMONIDOS, MITILIDOS, PECTINIDOS Y OSTREIDOS.

I.- ANTECEDENTES GENERALES DEL LABORATORIO

Nombre del Laboratorio: _____

Dirección: _____

Nombre de la persona que responde: _____

Cargo: _____

Número de Administrativos que trabajan en el Laboratorio

II.- ESPECIALIDAD

II.1.- Marque con una **X** la(s) especialidad(es) de su Laboratorio en el diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos.

Especialidad por Patógeno			
Virología	Bacteriología	Parasitología	Micología

Especialidad por Técnica				
Moleculares	Histológicas	Inmunológicas	Bioquímicas	Otras

II.2.- Indique los años de experiencia del Laboratorio, en el diagnóstico de:

Salmónidos	
Mitílidos- Pectínidos- Ostréidos	



III.- TECNICAS DE DIAGNOSTICO

III.1.- Marque con una **X**, las técnicas que utiliza su Laboratorio para el diagnóstico presunto (**P**) o confirmatorio (**C**) de los diferentes tipos de patógenos, en Salmónidos

Técnicas de Diagnóstico	TIPOS DE PATOGENOS									
	Virus		Bacterias		Rickettsias		Parásitos		Hongos	
	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C
Microscopía Óptica										
Microscopía Electrónica										
Tinción GRAM										
Tinción Giemsa										
Pruebas bioquímicas										
Aislamiento en Líneas Celulares										
Seroneutralización										
Inmunofluorescencia										
PCR										
Inmunoblot										
Aglutinación										
ELISA										
Inmunodifusión										
Otras (especifique):										

III.2.- Indique la línea celular que usted utiliza para el aislamiento de los patógenos señalados

Patógeno	Líneas Celulares						
	BF-2	CCO	CHSE-214	RTG-2	EPC	SHK-1	Otras
IPN							
Rickettsias							
IHN							
ISA							
Otro (especifique):							



III.3.- Marque con una **X**, las técnicas que utiliza su Laboratorio para el diagnóstico presunto (**P**) o confirmatorio (**C**) de los diferentes tipos de patógenos, en Mitílidos, Pictínidos y Ostréidos.

Técnicas de Diagnóstico	TIPOS DE PATOGENOS									
	Virus		Bacterias		Rickettsias		Parásitos		Hongos	
	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C
Microscopía Óptica										
Microscopía Electrónica										
Tinción GRAM										
Tinción Giemsa										
Tinción Hemacolor										
Pruebas bioquímicas										
Inmunofluorescencia										
PCR										
Aglutinación										
Histológicas										
Otras (especifique):										



IV.- EQUIPAMIENTO

IV.1.- Marque con una **X**, los equipos que posee su Laboratorio para el diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos:

Equipamiento	
Autoclave	
Balanza analítica	
Balanza granataria	
Balanza precisión	
Baño Termoregurable (Baño María)	
Cámara de flujo laminar vertical	
Cámara Polaroid	
Cámara flujo laminar horizontal	
Centrífuga refrigerada	
Centrífuga común	
Centrífuga de plancton	
Centrífuga de Ependorff	
Aparato de Electroforesis horizontal	
Aparato de Electroforesis vertical	
Aparato de Western blot	
Destilador	
Freezer	
Horno Pasteur (Estufa esterilización)	
Incubador	
Incubador de temperatura controlada	
Lector de ELISA	
Microscopio de contraste de fase	
Microscopio de epifluorescencia	
Microscopio electrónico	
Microscopio estereoscópico (lupa)	
Microscopio invertido	
Microscopio óptico	
Micrótomo	
PHmetro	
Refrigerador	
Termociclador	
Transiluminador	
Espectrofotómetro	
Micropipetas ajustables	
Agitador magnético	
Homogeneizador de tejidos	
Vortex	



IV.2.- Para los agentes que se listan a continuación anote una **C** si alguna vez, su Laboratorio lo ha diagnosticado en forma confirmatoria y una **P** si el diagnóstico ha sido sólo presunto.

AGENTE	ESPECIES DE SALMONIDOS EN CULTIVO				
	Salmón Coho	Salmón del Atlántico	Trucha Arcoiris	Salmón Chinook	Otras (indíquela)
Renibacterium salmoninarum					
Piscirickettsia salmonis					
Flavobacterium spp.					
Flavobacterium columnare					
Flavobacterium psychrophilum					
Flexibacter maritimus					
Flavobacterium aqualitis					
Flavobacterium hutchinsonii					
Yersinia ruckeri					
Vibrio spp.					
Aeromonas spp.					
Aeromonas hydrophila					
Aeromonas salmonicida atípica					
Pseudomonas spp.					
Pseudomonas aeruginosa					
Streptococcus spp.					
Streptococcus fecalis					
Enterococcus sp.					
Necrosis pancreática infecciosa (IPN)					
Anemia infecciosa del salmón (ISA)					
Leucosis linfloblastica					
Ichthyobodo necatrix					
Ichthyophthirius multifiliis					
Chilodonella spp.					
Hexamita spp.					
Microsporidium spp.					
Nucleospora salmonis					
Kudoa sp.					
Caligus spp.					
Ergasilus sp.					
Ceratomyxa					
Trichodina sp.					
Otros agentes (especificar)					

Si alguna vez su laboratorio ha diagnosticado enfermedades de origen desconocido anótelas:



IV.3.- Para los agentes que se listan a continuación anote una **C** si alguna vez, su Laboratorio lo ha diagnosticado en forma confirmatoria y una **P** si el diagnóstico ha sido sólo presunto.

AGENTES	ESPECIE DE MOLUSCOS EN CULTIVO						
	Ostión del Norte	Ostra Japonesa	Ostra Chilena	Choro Zapato	Chorito	Cholga	Otras (indíquela)
Vibrio alginolyticus							
Vibrio parahaemolyticus							
Vibrio vulnificus							
Vibrio anguillarum							
Vibrio ordalii							
Pasteurella piscicida							
Pasteurella sp.							
Aeromonas hydrophila							
Pseudomonas sp.							
Moraxella sp.							
Enterobacter sp.							
Polydora spp.							
Bonamia like							
Protozoos ciliados externos							
Protozoos ciliados internos							

Si alguna vez su Laboratorio ha diagnosticado enfermedades de origen desconocido anótelas:

V.- INVESTIGACION Y PERFECCIONAMIENTO

V.1.- En los últimos 3 años, su Laboratorio, ¿ha estado vinculado a Proyectos de Investigación, ya sea de financiamiento propio o externo?

Si	Indique:	
	Nombre del Proyecto	Fuente de Financiamiento
No		



V.2.-En los últimos 3 años, su Laboratorio, ¿ha apoyado actividades de perfeccionamiento para su personal? Marque con una **X** lo que corresponda.

Si	<input type="checkbox"/>
No	<input type="checkbox"/>

V.3.- En los últimos 3 años, ¿El personal de su Laboratorio, ha asistido o asiste, a cursos de perfeccionamiento y/o pasantías? Marque con una **X** lo que corresponda.

Si	<input type="checkbox"/>	Indique:																														
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nombre de la actividad</th> <th>Año</th> <th>Especialidad del asistente</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>	Nombre de la actividad	Año	Especialidad del asistente																											
Nombre de la actividad	Año	Especialidad del asistente																														
No	<input type="checkbox"/>																															

V.4.- En los últimos 3 años, ¿se han presentado trabajos generados en su Laboratorio, en eventos científicos (simposios, talleres, etc.), nacionales o internacionales?. Marque con una **X** lo que corresponda.

Si	<input type="checkbox"/>	Indique:																												
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nombre del trabajo</th> <th>Evento</th> <th>Año</th> <th>Lugar</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>	Nombre del trabajo	Evento	Año	Lugar																								
Nombre del trabajo	Evento	Año	Lugar																											
No	<input type="checkbox"/>																													



VI.- ESPACIO FISICO

VI.1.- En el siguiente cuadro, enumere las salas con que cuenta su Laboratorio para el diagnóstico y, para cada una de dichas salas, indique las áreas a que son destinadas, utilizando los códigos de la siguiente lista:

- | | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| a) Lavado | e) Histología | i) Cámara fría |
| b) Esterilización | f) Cultivos Celulares | j) Oficinas |
| c) Necropsia | g) Biología molecular | k) Procesamiento de muestras virales |
| d) Microscopía | h) Bioensayos | l) Otros |

Ejemplo:

Salas	Areas
1	a+b+c
2	j

Salas	Areas

VI.2.- Su Laboratorio ¿ha establecido convenios de "asistencia técnica con laboratorios y/o expertos internacionales?

Si	Identifíquelos
No	

VI.3.- Indique la periodicidad con que su Laboratorio ha recibido visita de expertos, en los últimos 3 años. Marque con una **X** lo que corresponda.

Nunca	
Una vez al año	
Dos veces al año	
Otra frecuencia (especifique)	

Observaciones:



**Encuesta a Laboratorios de Investigación
Proyecto FIP 2001/09
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN ENFERMEDADES DE SALMÓNIDOS,
MITÍLIDOS, PECTÍNIDOS Y OSTREIDOS.**

I.- ANTECEDENTES GENERALES DEL LABORATORIO

Institución: _____

Dirección: _____

Nombre del responsable del Laboratorio: _____

Título ^{y/o} Grado Académico del responsable: _____

II.- ESPECIALIDAD

II.1.- Marque con una X la(s) especialidad(es) de su Laboratorio en la investigación de enfermedades de organismos acuáticos.

Especialidad por Patógeno			
Virología	Bacteriología	Parasitología	Micología

Especialidad por Técnica				
Moleculares	Histológicas	Inmunológicas	Bioquímicas	Otras

II.2.- Indicar los años de experiencia del Laboratorio, en la investigación de:

Salmónidos	
Mitílidos- Pectínidos- Ostreidos	



III.- EQUIPAMIENTO

III.1.- Marque con una X, los equipos que posee su Laboratorio para la investigación de enfermedades de organismos acuáticos:

Equipamiento	
Autoclave	
Balanza analítica	
Balanza granataria	
Balanza precisión	
Baño Termoregulable (Baño María)	
Cámara de flujo laminar vertical	
Cámara Polaroid	
Cámara flujo laminar horizontal	
Centrífuga refrigerada	
Centrífuga común	
Centrífuga de plancton	
Centrífuga de Ependorff	
Aparato de electroforesis horizontal	
Aparato de electroforesis vertical	
Aparato de Wester blot	
Destilador	
Freezer (-80)	
Freezer (-20)	
Horno Pasteur (Estufa esterilización)	
Incubador	
Incubador de temperatura controlada	
Lector de ELISA	
Microscopio de contraste de fase	
Microscopio de epifluorescencia	
Microscopio electrónico	
Microscopio estereoscópico (lupa)	
Microscopio invertido	
Microscopio óptico	
Micrótopo	
PHmetro	
Refrigerador	
Termociclador	
Transiluminador	
Espectofotómetro	
Micropipetas ajustables	
Agitador magnético	
Homogeneizador de tejidos	
Vortex	
Rollex	
Secuenciador	
HPLC	



III.3.- Indique cuál(es) de los siguientes patógenos de Moluscos, han sido estudiados en su laboratorio

TECNICA UTILIZADA	PATOGENOS ESTUDIADOS				
	Virus	Bacterias	Protozoos	Hongos	Otros (indíquelo)
Histológica:					
- Clásica					
- Histoquímica					
- Inmunohistoquímica					
Microbiológicas:					
- Pruebas bioquímicas					
Inmunológicas:					
- I/D/FAT					
- ELISA					
- Radioinmunoensayo					
- Aglutinación					
- Dot Blot					
- Western Blot					
- Fijación complemento					
Moleculares:					
- PCR					
- Hibridación					
- Secuenciamiento					
- North Blot					
- Southern Blot					
Otras:					



IV.- INVESTIGACION Y PERFECCIONAMIENTO

IV.1.- Haga un listado con la(s) línea(s) de investigación principal y sus derivadas en que se desarrolla su Laboratorio

Linea de Investigación Principal	Líneas derivadas
1.-	
2.-	
3.-	
4.-	

IV.2.- En los últimos 3 años, el personal estable de su Laboratorio, ¿ha estado vinculado a Proyectos de Investigación concursable?

Si		Nombre del Proyecto	Fuente de Financiamiento	Nivel de Responsabilidad
No				

IV.3.- En los últimos 3 años, ¿El personal de su Laboratorio, ha asistido a cursos de perfeccionamiento y/o pasantías?

Si		Nombre de la actividad	Año	Especialidad del asistente
No				



IV.4.- En los últimos 3 años, ¿se han presentado trabajos generados en su Laboratorio, en eventos científicos (simposios, talleres, etc.), nacionales o internacionales?. Marque con una **X** lo que corresponda.

Si		Indique:			
		Nombre del trabajo	Evento	Año	Lugar
No					

IV.5.- En los últimos 3 años, ¿se han publicado trabajos generados en su Laboratorio?. Marque con una **X** lo que corresponda.

Si		Indique:			
		Título	Autor	Año	Revista
No					

IV.6.- Indique la periodicidad con que su Laboratorio ha recibido visita de expertos, en los últimos 3 años. Marque con una **X** lo que corresponda.

Nunca	
Una vez al año	
Dos veces al año	
Otra frecuencia (especifique)	



V.- ESPACIO FISICO

V.1.- En el siguiente cuadro, enumere las salas con que cuenta su Laboratorio y, para cada una de dichas salas, indique las áreas a que son destinadas, utilizando los códigos de la siguiente lista:

- | | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| a) Lavado | e) Histología | i) Cámara fría |
| b) Esterilización | f) Cultivos Celulares | j) Oficinas |
| c) Necropsia | g) Biología molecular | k) Procesamiento de muestras virales |
| d) Microscopía | h) Bioensayos | l) Otros |

Ejemplo:

Salas	Areas
1	a+b+c
2	j

Salas	Areas

Observaciones:

PROYECTO FIP N° 09/2001

ANEXO III

MANUAL

**“ TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO DE
ENFERMEDADES DE SALMONIDOS, MITILIDOS,
PECTINIDOS Y OSTREIDOS”**

Unidad Ejecutora

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR**

Investigador Principal:
Investigadores Asociados:

Mariel Campalans B.
Patricia Rojas Z.
Jacqueline Campalans B.
Inés Guerrero S.

Subcontrato

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Co-Investigador:
Técnico

Sandra Bravo S.
Ximena Figueroa L.

2002

PRESENTACION

El presente Manual ha sido estructurado en dos secciones de contenidos, constituyendo cada uno de ellos un manual completo dedicado a un tipo de organismo. Es así como en la primera sección se describen los procedimientos para el diagnóstico de enfermedades de salmónidos y, en la segunda, los procedimientos para el diagnóstico de las enfermedades de moluscos.

En cada uno de ellos, se comienza con la descripción de los procedimientos de muestreo de los organismos en cultivo, continuando con el detalle de las técnicas de diagnóstico de uso rutinario y se finaliza con los procedimientos de diagnóstico específicos para las enfermedades denominadas de importancia en la producción de los organismos de cultivo.

SECCION 1

MANUAL DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE SALMONIDOS

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
I. PLAN DE MUESTREO Y NECROPSIA	2
I.1. Plan de Muestreo	2
I.2. Necropsia	3
I.2.1. Condiciones de Asepsia	3
I.2.2. Embalaje y Transporte	4
II. ENFERMEDADES VIRALES	6
II.1. Procedimientos Generales	6
II.1.1. Procedimiento para obtención de muestras virales	6
II.1.2. Procedimientos para el aislamiento del virus en líneas celulares	8
II.1.3. Procedimientos para la identificación confirmatoria del virus	12
II.2. Procedimientos Específicos	15
II.2.1. Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)	15
II.2.1.a) Aislamiento del IPNV en líneas celulares	16
II.2.1.b) Identificación del IPNV aislado en cultivo celular	17
II.2.1.c) Identificación del IPNV aislado desde tejidos del pez	22
II.2.2. Anemia Infecciosa del Salmón (ISA)	24
II.2.2.a) Aislamiento del ISAV en líneas celulares	24
II.2.2.b) Identificación del ISAV en cultivo celular	25
II.2.2.c) Identificación del ISAV aislado desde tejidos del pez	25

III. ENFERMEDADES BACTERIANAS.....	30
III.1. Procedimientos Generales	30
III.1.1. Manipulación de las muestras	30
III.1.2. Procedimientos de detección e identificación	31
III.1.3. Procedimientos de identificación confirmatoria	32
III.2. Procedimientos Específicos	36
III.2.1. Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD)	36
III.2.1.a) Aislamiento	36
III.2.1.b) Detección e identificación por métodos serológicos	37
III.2.2. Piscirickettsiosis	47
III.2.2.a) Identificación de <i>P. salmonis</i> en frotis de tejido teñido con Acridina-Orange	48
III.2.2.b) Tinción Giemsa	49
III.2.2.c) Aislamiento de <i>P. salmonis</i> en cultivo celular	49
III.2.2.d) Identificación de <i>P. salmonis</i> aislada en cultivo celular	49
III.2.3. Yersiniosis o Enfermedad entérica de la Boca Roja (ERM)	52
III.2.3.a) Identificación presunta	52
III.2.3.b) Diagnóstico confirmatorio	53
III.2.4. Furunculosis	55
III.2.4.a) Diagnóstico presunto	55
III.2.4.b) Diagnóstico confirmatorio	56
III.2.5. Flavobacteriosis	57
III.2.5.a) Diagnóstico presunto	57
III.2.5.b) Diagnóstico confirmatorio	57
IV. ENFERMEDADES PARASITARIAS	63
IV.1. Procedimientos Generales	63
IV.1.1. Procedimientos generales de Necropsia	64
IV.1.1.a) Análisis de sangre	64
IV.1.1.b) Exámenes externos	65
IV.1.1.c) Exámenes internos	67
IV.1.1.d) Fijación y tratamiento de los Parásitos	69

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I: Tamaño mínimo de muestra para encontrar un espécimen infectado, con un 95% de confianza, por porcentaje de incidencia y tamaño poblacional.	3
Tabla II: Tiempo máximo para la extracción de ARN, utilizado RNA later como medio de transporte, por temperatura de almacenaje.	5
Tabla III: Tejidos a analizar por longitud/madurez del pez.	6
Tabla IV: Características de las líneas celulares utilizadas para el diagnóstico de virus en peces.	8
Tabla V: Inoculaciones sugeridas para varios recipientes de cultivo.	10
Tabla VI: Caracteres bioquímicos distintivos de Citofagáceos y Flavobacteriáceos.	59
Tabla VII: Caracteres bioquímicos distintivos de las enterobacterias más frecuentes en peces.	60
Tabla VIII: Caracteres distintivos de <i>aeromonas</i> frecuentes en peces.	61
Tabla IX: Características de <i>Renibacterium salmoninarum</i> .	62
Tabla X: Métodos recomendados para la preservación de parásitos destinados a la identificación.	71

INTRODUCCIÓN

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 del país que ha sido complementada con el aporte de algunos laboratorios nacionales que realizan diagnóstico en organismos acuáticos de cultivo.

Se ha empleado como modelo y base el manual de diagnóstico de la OIE (versión 2000), mundialmente aceptado como manual de procedimientos para la detección e identificación de algunos patógenos de peces, moluscos y crustáceos. Las técnicas que no aparecen en el mencionado manual, han sido extraídas de *Fish Health Blue Book* (Thoesen, 1994) y de publicaciones científicas especializadas.

En este documento, que se ha organizado en tres partes, se describen las técnicas de diagnóstico de las principales enfermedades que están presentes en los salmónidos cultivados en el país y que tienen un impacto económico importante. En su primera parte, se describen los procedimientos que se deben tener en cuenta para obtener las muestras que han de analizarse. En la segunda parte, se presentan los procedimientos generales para el diagnóstico de enfermedades virales y, específicamente, se describen los procedimientos utilizados para la detección de IPN e ISA. La tercera parte corresponde a los procedimientos para la detección de bacterias, por lo que se describen los procedimientos para *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacter psychrophilus* y *Aeromonas salmonicida* atípica. La cuarta parte se refiere a parásitos, incluidos *Kudoa thyrsites* y *Nucleospora salmonis*. En la parte final de este Manual, se describen los procedimientos para detección de hongos.

I. PLAN DE MUESTREO Y NECROPSIA

I.1. Plan de muestreo

El primer paso en la investigación de enfermedades es identificar la población o **lote** bajo estudio, entendiendo por lote a un grupo de peces de la misma especie y edad, que comparten la misma fuente de agua y que se originaron de un desove discreto.

El lote o población de peces a investigar, puede o no presentar sintomatología de la enfermedad. Es decir, un lote puede ser sintomático (clínicamente enfermo) o asintomático y, en cada caso, el número de peces (tamaño de la muestra) necesarios para identificar el patógeno es diferente. En cualquier caso, los peces deben ser tomados al azar y estar vivos al momento de la colecta.

- ❖ Para lotes de peces que exhiben signos clínicos, se requiere una muestra de al menos 10 peces moribundos o que muestren síntomas.
- ❖ Para lotes asintomáticos, la muestra debe ser de un tamaño tal que garantice con un nivel de confianza y un nivel de incidencia determinados, que los especímenes infectados serán incluidos entre los peces muestreados. Debido a que lo más habitual es considerar un 95% de confianza y asumir niveles de incidencia de la enfermedad de 2, 5 ó 10 %, la Tabla I presenta los tamaños de muestra mínimo para dichos casos, considerando distintos tamaños poblacionales.

Por otra parte, el plan de muestreo también se rige por el tamaño y número de unidades de crianza en los cuales se mantienen los peces de cada lote. Si los peces se encuentran en más de una unidad de crianza, en cada una de ellas deben tomarse submuestras de tamaños aproximadamente iguales.

Tabla I: Tamaño de muestra mínimo para encontrar un espécimen infectado, con un 95% de confianza, por Porcentaje de Incidencia y Tamaño Poblacional.

TAMAÑO POBLACIONAL	PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD		
	2%	5%	10%
50	50	30	20
100	80	45	25
250	110	50	25
500	130	55	30
1000	140	55	30
2500	145	60	30
5000	145	60	30
>=10000	150	60	30

Fuente: Austin, B. y B.A. Austin (Eds.) 1991.

Si los peces no pueden transportarse vivos al laboratorio, se debe realizar la necropsia y obtener las muestras para análisis, las cuales deben ser almacenadas en bolsas plásticas selladas, rotuladas y mantenidas en hielo.

I.2. Necropsia¹

I.2.1. Condiciones de Asepsia

Para los procedimientos de necropsia, existen 4 niveles de exigencia aséptica para las muestras que serán obtenidas desde cada pez, los cuales están determinados por el uso que se le dará a dichas muestras.

- i) Las muestras para aislamiento de patógenos bacterianos, se deben coleccionar asépticamente para ser dispuestas en medios para crecimientos bacteriológicos.
- ii) Las muestras para virología que van a ser inoculadas en cultivos celulares y que son descontaminadas antes de la siembra en células, no requieren una manipulación aséptica,

¹ Adaptado de Thoesen, 1994.

- pero deberán ser colectadas lo mas limpiamente posible para reducir la posibilidad de contaminación.
- iii) Las muestras para inmunodetección de patógenos bacterianos por la prueba del anticuerpo fluorescente, no necesitan ser colectadas asépticamente, aunque es recomendable evitar la contaminación con el contenido intestinal y el alimento para reducir las reacciones cruzadas por bacterias contaminantes.
 - iv) Las muestras para detección de parásitos y pruebas moleculares no requieren ser colectadas en condiciones de asepsia.

I.2.2. Embalaje y Transporte²

En general, las muestras deben ser transportadas a 4°C. Se debe evitar congelarlas.

Los tubos que contienen muestras de tejido para examen virológico o análisis de RT-PCR, se colocan en contenedores individuales (por ejemplo cajas de poliestireno gruesas) con suficiente hielo o bloques de hielo para asegurar el enfriamiento de las muestras entre 0 y 8°C. Se debe evitar congelarlas. Sólo en circunstancias excepcionales, las muestras para RT-PCR pueden ser congeladas instantáneamente y transportadas al laboratorio a -20°C o menos.

Los portaobjetos para IFAT se colocan en contenedores de portaobjetos con suficiente desecante para mantener las impresiones de tejido secas y frías.

Si los tejidos de peces son transportados en solución fijadora para examen histológico, deben ser enviadas en tubos herméticos, colocados en contenedores resistentes al impacto, tales como cajas de poliestireno de paredes gruesas.

Los peces enteros pueden ser transportados al laboratorio, cuidando de mantener la temperatura baja, se deben envolver en papel absorbente y embalar en bolsas plásticas.

Para análisis de PCR de tejidos preservados en RNA later, la extracción de ARN se debe realizar dentro del tiempo indicado en la Tabla II, según la temperatura de almacenaje de las muestras.

² Adaptado de Thoesen, 1994.

Tabla II: Tiempo máximo para la extracción de ARN, utilizando RNA later como medio de transporte, por Temperatura de Almacenaje

TEMPERATURA	TIEMPO MAXIMO
37°C	1 día
25°C	1 semana
4°C	1 mes
-20°C	Indefinidamente

II. ENFERMEDADES VIRALES

II.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

II.1.1. Procedimiento para obtención de muestras virales

Los tejidos utilizados en los análisis virales, dependen del tamaño y etapa de vida del pez, como se muestra en la Tabla III.

Tabla III: Tejidos a analizar por Longitud/Madurez del pez

Longitud/Madurez	Tejido
Menos de 4 cm.	Pez completo (sin saco vitelino)
4 a 6 cm.	Todas las vísceras (incluyendo riñones)
Más de 6 cm.	Riñones, bazo.
Sexualmente Maduros	Fluido ovárico (FO), riñones, bazo.

- ❖ Las muestras se pueden agrupar para que el número de unidades de ensayo resulte práctico.
- ❖ No se debe combinar mas de cinco peces para formar un grupo o pool
- ❖ No se debe mezclar fluido ovárico con fluido seminal en un mismo pool.
- ❖ El FO de hembras maduras se debe procesar separadamente de las muestras viscerales.
- ❖ También se puede realizar el análisis sólo con el FO, sin matar a las hembras reproductoras.
- ❖ Los exámenes virológicos se deben comenzar lo más rápido posible, no más allá de 48 horas después de coleccionar las muestras

➤ **Obtención de muestras desde reproductores (o hembras maduras)**

- i) Con una jeringa de 5 mL sin aguja, obtener 1mL de FO durante el desove de una hembra
- ii) Repetir la operación utilizando recipientes separados para la colecta de los huevos, hasta completar un máximo de 5 hembras para formar el pool de FO.
- iii) Mezclar por inversión varias veces.
- iv) Tapar la jeringa, rotular si es necesario y colocarla en un recipiente con hielo o mantenerlo a 4°C hasta el momento de su procesamiento.

➤ **Obtención de muestras desde tejidos**

Realizar la disección del pez en condiciones asépticas adecuadas de acuerdo al análisis. Cuando se procesa un mismo lote no es necesario desinfectar los instrumentos y equipos que se utilicen.

- i) Con un bisturí limpio y desinfectado, cortar un trozo de riñón medio de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ y colocar en un recipiente adecuado al volumen de solución de mantención que se usará.
- ii) Cortar un trozo de bazo correspondiente a $1/3$ del trozo de riñón. Extraer el bazo entero cuando éste sea menor a 1 cm^3
- iii) Colocar los tejidos obtenidos dentro de un recipiente limpio y desinfectado (resultan adecuados los recipientes para muestras de orina), conteniendo solución salina tamponada (PBS o HPBS, pH 7,4 – 7,6), o medio de cultivo celular. Opcionalmente y tomando en cuenta el tiempo que se requerirá para el transporte, se puede agregar al medio de transporte los antibiótico gentamicina ($1000 \mu\text{g/mL}$) o penicilina (800 Unidades Internacionales [IU]/mL) / estreptomycin (800 $\mu\text{g/mL}$). Se puede incorporar, además, un compuesto antimicótico como Mycostatina® o Fungizona® a una concentración final de 400 IU/mL. Se recomienda agregar suero o albúmina (5-10%), para estabilizar el virus, si el transporte excede a 12 horas.
- iv) Utilizar como medio de transporte aproximadamente 4 veces el volumen de todos los tejidos tomados desde los 5 peces. Si se extraen 0,5 g de cada tejido se tendría 7,5 g de tejidos por pool, lo que requiere 30 mL de PBS /antibiótico/ pool.
- v) Las muestras se deben mantener a una temperatura de entre 4 y 10°C, nunca congelarlas.

II.1.2. Procedimientos para el aislamiento del virus en líneas celulares

Para la inoculación de las muestras se debe usar células de menos de 72 horas de crecimiento, preferentemente preparadas 48 horas previas a la inoculación de las muestras, 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.

En cada ensayo viral deben incubarse controles no inoculados y negativos (inoculados con solución PBS 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.

Las líneas celulares utilizadas para los crecimientos de virus desde los peces son:

- Bluegill fry (BF-2)
- Chanel catfish ovary (CCO)
- Embrión de salmón Chinook (CHSE-214)
- Epithelioma papulosum cyprini (EPC)
- Gónada de trucha Arcoiris (RTG-2)

Las características de estas líneas celulares se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV: Características de las líneas celulares utilizadas para el diagnóstico de virus en peces.

CARACTERISTICAS	LINEAS CELULARES				
	BF-2	CCO	CHSE-214	RTG-2	EPC
Morfología celular	Fibroblástica	Fibroblástica/ epitelial	Epitelial	Fibroblástica	Epitelial
Rango de temperatura (°C)	15-28	15-35	4-25	4-25	10-33
Temperatura óptima de crecimiento (°C)	20	30	20	20	30
Inóculo (N° de células x 10 ⁴ /cm ²)	20	35	50	40	30
Densidad de saturación (número de células x 10 ⁴ /cm ²)	150	300	300	200	300

Fuente: Manual OIE (2000)

Además, recientemente se ha incorporado la línea SHK-1 obtenida desde el riñón anterior del Salmón Atlántico (Atlantic salmon head kidney) para el aislamiento del virus ISA.

➤ **Control de Calidad de las líneas celulares**

Todos los stocks de cultivos celulares usados para los ensayos virales se deben probar a intervalos de tres meses para advertir la eventual presencia de *Mycoplasma spp.* Las pruebas pueden hacerse en laboratorios calificados, comerciales o universitarios. Alternativamente, se puede obtener nuevos stocks celulares desde la American Type Culture Collection (ATCC) u otras fuentes certificadas de células libres de Mycoplasma.

Todos los componentes de los medios que no sean esterilizables en autoclave se deben probar y encontrarse libres de *Mycoplasma spp.*, de factores inhibidores del crecimiento celular y/o de la replicación viral. Los sueros certificados libres de Mycoplasma y otros reactivos certificados no necesitan ser probados.

El control positivo debe demostrar que las células son sensibles a todos los virus de peces que sean analizados. Si esto no fuera posible, las células deben enviarse periódicamente a un laboratorio para reafirmar su sensibilidad a los virus de interés. La sensibilidad será definida como la habilidad de las células de mostrar efecto citopático (ECP) cuando son expuestas a múltiples infecciones de 10^2 TCID₅₀ (Dosis infectiva del 50% del tejido celular) por célula.

➤ **Aislamiento de virus desde muestras de tejido**

Todo el equipo, incluido el material quirúrgico, se debe esterilizar entre lotes de muestreo. Los procedimientos para el aislamiento de virus desde muestras de tejido, se realizan bajo los 15°C, de preferencia entre 0 y 4°C.

- i) Decantar el medio de transporte desde la muestra de órganos. La relación final entre tejido y medio de transporte debe ser ajustada a 1:10
- ii) Triturar los tejidos con un mortero o con un homogenizador eléctrico (Stomacher[®]) en el medio de transporte hasta obtener una pasta. Si se utiliza un homogenizador eléctrico, la muestra de tejido se coloca en bolsas plásticas y se homogeniza por 1 minuto.
- iii) Centrifugar en centrífuga refrigerada de 2 a 5°C, entre 2000 a 4000 x g, por 15 minutos.
- iv) Si las muestras no han sido tratadas con antibióticos antes de la homogenización, el sobrenadante se debe suspender en un medio suplementado con antibiótico, por 4 horas a 15°C o toda la noche a 4°C. Si el medio de transporte de las muestras fue hecho con antibióticos, el tratamiento del sobrenadante puede ser omitido. Las muestras de fluido

ovárico se pueden tratar con antibióticos para controlar la contaminación microbiana. En ningún caso se pueden diluir las muestras de tejido ni FO más de dos veces.

- v) Inocular un volumen mínimo de cada muestra sobre los cultivos celulares apropiados, de acuerdo a lo especificado en la Tabla IV.

Tabla V: Inoculaciones sugeridas para varios recipientes de cultivo.

RECIPIENTES	VOLUMEN DE MUESTRA	SUSPENSIÓN DE CULTIVO CELULAR
Placa de 96 pozos	0,05 mL/pozo	0,10 mL/pozo
Cápsula de 35 mm	0,10 mL/placa	Monocapa
Cápsula de 60 mm	0,30 mL/placa	Monocapa
Placa de 24 pozos	0,25 mL/pozo	1,0 mL/pozo
Placa de 6 pozos	1,0 mL/pozo	3,0 mL/pozo
Botella de 25 cm ²	1,0 mL/botella	5,0 mL/botella
Botella de 175 cm ²	5,0 mL /botella	30 mL/botella

➤ **Inoculación en Líneas Celulares**

Para prevenir interferencias homólogas, la suspensión de órganos tratados con antibióticos se inoculará en las células en dos diluciones

- *la primaria* que resulta en una dilución final de 1:100
- *la adicional* que resulta en una dilución final de 1:1000.

En el caso de utilizar fluido ovárico o seminal, la dilución final no excederá 1:10 (v/v).

- i) De cada grupo se inoculará un mínimo de dos unidades de cultivo de cada línea celular. Inocular al menos 2 cm² de la monocapa celular (en placa de 24 pozos, sembrar 2 pozos con 100 µL de muestra diluida en cada uno).
- ii) Dejar reposar por 30 minutos a 1 hora entre 15 y 22°C y, sin retirar el inóculo, agregar el medio de cultivo celular tamponado a pH 7,6 y suplementado con 2% de suero bovino fetal (1 mL/ por pozo para los 24 pozos de la placa) e incubar a 22°C en un incubador refrigerado, usando temperatura controlada para asegurar un aislamiento exitoso.

- iii) La temperatura de incubación será impuesta por el virus en consideración. Durante el período de incubación, el pH del cultivo celular se debe mantener entre 7,0 y 7,8 o bien seguir las recomendaciones para la incubación del virus que se trata de aislar. Si las células se incuban al 5% de CO₂ atmosférico se requiere tamponar el medio de crecimiento con bicarbonato para un pH 7,4 – 7,8. Para cubrir los pozos, se puede usar la tapa de poliestireno rígida que viene con las placas. Cuando las placas se cultivan en temperatura ambiente, se puede utilizar una cubierta de plástico flexible y adhesiva (Mylar™) para cubrir la superficie, sellando alrededor de los pozos y bordes de la placa, o bien utilizar un medio de cultivo compatible con el ambiente atmosférico, tal como MEM-10 tamponado con HEPES o usar Liebowitz' L-15 con suero bovino fetal al 10%.
- iv) Seguir el curso de la infección a través de controles positivos y negativos, por medio de la observación microscópica diaria a 40X y 100X de aumento, por 14 días. Se recomienda el uso de un microscopio con contraste de fase.

Si no se desarrolla ECP en los cultivos inoculados (a pesar de la progresión normal de ECP en el virus control), estos se deben someter a subcultivo por 7 días adicionales. El virus control debiera debilitarse para desarrollar ECP y el proceso debe repetirse con células susceptibles frescas y nuevas partidas de muestras.

El procedimiento para los subcultivos es:

- i) Obtener alícuotas del medio de cultivo celular, desde todas las monocapas inoculadas con diluciones de cada sobrenadante del homogeneizado de órganos.
- ii) Centrifugar a 2000 x g por 15 minutos a 4°C y colectar el sobrenadante.
- iii) Inocular las monocapas celulares e incubar.

Si aún así no ocurre ECP, el ensayo puede ser declarado negativo.

Si aparece un ECP en las células inoculadas con las diluciones de los sobrenadantes homogeneizados, se debe ejecutar inmediatamente los procedimientos para la identificación.

II.1.3. Procedimientos para la identificación confirmatoria del virus

Las técnicas comúnmente recomendadas y descritas en la mayoría de los manuales de procedimientos (OIE, Blue-Book, etc.) para la identificación confirmatoria de agentes virales, se basan en el reconocimiento del antígeno del virus. Para llevar a cabo estos procedimientos se utilizan anticuerpos específicos (poli o monoclonales). Existe una variedad de técnicas de estas características en uso, presentando cada una atributos propios en cuanto a sensibilidad, rapidez, simplicidad de aplicación, disponibilidad comercial de insumos o reactivos. Se debe agregar que, comencialmente, en Chile existen kits de diagnóstico rápido para varias de estas técnicas.

Las técnicas que se recomiendan para la identificación confirmatoria de virus son:

- Neutralización viral
- Técnica del anticuerpo fluorescente (IFAT)
- Técnica inmunoenzimática (ELISA).
- Últimamente, comienza a ser frecuente el uso de métodos moleculares, como es el caso de RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa de tanscripción reversa).

➤ **Técnica de Neutralización Viral**

La neutralización es una reacción antígeno-anticuerpo en la cual el efecto de una exotoxina bacterial o viral es bloqueado por anticuerpos específicos. En esta reacción los anticuerpos (Ig G) específicos inactivan el virus bloqueando sus sitios de ataque a las células huésped.

Esta prueba es comparativamente compleja y tiende a ser menos común en laboratorios clínicos modernos.

➤ **Test del Anticuerpo fluorescente (IFAT)**

Es una técnica basada en la propiedad de las moléculas de anticuerpo, las que pueden adquirir fluorescencia si se les agrega químicamente un compuesto orgánico fluorescente como la Rodamina B o Isocianato de Fluoresceína (FITC), la cual no modifica la especificidad del anticuerpo.

Este procedimiento permite visualizar los anticuerpos adsorbidos por la muestra problema mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia.

Se emplean dos procedimientos de tinción diferentes, el directo y el indirecto. En el directo, los anticuerpos contra el organismo son en sí mismos fluorescentes. En el método indirecto, la presencia de un anticuerpo sobre la superficie de la célula queda detectado por el empleo de otro anticuerpo fluorescente dirigido contra el mismo anticuerpo específico. Esto es posible debido a que las inmunoglobulinas, como todas las proteínas, son antigénicas, y las inmunoglobulinas de la especie de un animal pueden inducir la formación de anticuerpos en otro. Por esta razón, las inmunoglobulinas fluorescentes de carnero anticonejo, pueden emplearse para detectar la presencia de la inmunoglobulina de conejo absorbido por las células. Una ventaja de este procedimiento es que no se necesita hacer anticuerpos fluorescentes para cada organismo de interés.

Existen kits para IFAT disponibles comercialmente. En Chile son distribuidos por Bios Chile y DiagXotics Inc. (Apéndice II)

➤ **Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).**

Esta técnica, llamada ELISA debido a las iniciales de “Enzyme-linked immunoabsorbent assay”, utiliza los anticuerpos a los que se han enlazado covalentemente las enzimas. Es una técnica inmunológica ampliamente usada. La unión covalente de enzimas a las moléculas de anticuerpos sin alterar las propiedades catalíticas de éstas y la especificidad del anticuerpo, produce una herramienta inmunológica que posee alta sensibilidad y alta especificidad.

Se han desarrollado dos metodologías básicas de ELISA, una para detección del antígeno (ELISA directo) y otra para anticuerpos (ELISA indirecto). Se describe el procedimiento para ELISA directo, que es el método utilizado para detectar patógenos de peces. En dicho procedimiento el antígeno queda atrapado entre dos capas de anticuerpos, el segundo anticuerpo contiene una enzima conjugada y es también específico para el antígeno.

Existen kits de ELISA disponibles comercialmente. En Chile son distribuidos por Bios Chile y DiagXotics Inc.(Apéndice II)

➤ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Es una técnica molecular basada en la amplificación rápida de un trozo de la cadena de ADN, produciendo en pocas horas cantidades suficientes para análisis.

En esta técnica, una muestra es incubada con dos oligómeros (primers), una ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa) obtenida de una bacteria termófila, nucleótidos y tampones.

Los primers son secuencias cortas de ADN que son complementarios a las extremidades de una secuencia genética conocida del ADN viral. Estos se complementan con la secuencia apropiada del ADN y actúan como iniciadores para la polimerasa, que copia el segmento del ADN. Enseguida, la muestra es calentada para desnaturalizar el ADN (separando los ligamentos de la doble hélice) y enfriada para permitir la complementación de los primers con el nuevo ADN. Cada copia del ADN se vuelve un nuevo modelo. El proceso es repetido numerosas veces (20-40 ciclos) para amplificar la secuencia original de ADN. Por este método una secuencia puede ser amplificada un millón de veces.

La técnica RT-PCR, que es una variación de la PCR, involucra el uso de la enzima transcriptasa reversa de retrovirus para convertir el ARN viral en ADN antes de la amplificación por PCR.

Existen kits para RT-PCR disponibles comercialmente. En Chile distribuye DiagXotics, Inc. y Bios Chile (Apéndice II).

II.2. PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS

II.2.1. Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)³

La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad viral altamente contagiosa en juveniles de salmónidos, mantenidos bajo condiciones de cultivo intensivo. La enfermedad comúnmente ocurre en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), trucha café (*Salmo trutta*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y otras especies de salmón del Pacífico. El virus del IPN también ha sido reportado como causante de enfermedad en peces marinos sometidos a cultivo.

La enfermedad tiene un amplio rango geográfico, se presenta en la mayoría de los criaderos de salmónidos de países localizados en Norteamérica, Sudamérica, Europa y Asia.

La identificación inmunológica del IPNV, a partir del aislamiento del virus en cultivo celular, se realiza por medio de las técnicas de Neutralización, ELISA e IFAT. Recientemente, se ha incorporado la técnica molecular RT-PCR como procedimiento identificatorio del IPNV.

Las técnicas IFAT, ELISA y RT-PCR, también se pueden realizar directamente desde tejidos infectados.

El manual de la OIE indica que, debido al poco conocimiento de las reacciones serológicas de peces a las infecciones virales, no se recomienda la detección de los anticuerpos como método de diagnóstico.

A continuación se describen los protocolos de las siguientes técnicas:

- Aislamiento en cultivo celular
- Neutralización
- IFAT
- ELISA
- RT-PCR

³ Adaptación de OIE, 2000

II.2.1.a) Aislamiento del IPNV en líneas celulares

Se recomienda utilizar las líneas celulares **BF-2** o **CHSE-214**.

➤ **Inoculación de las monocapas celulares**

- i) Diluir la muestra conteniendo el virus a una dilución final 1:100 y una dilución adicional de 1:1000 de los sobrenadantes del homogeneizado de los órganos y traspasar un volumen apropiado de cada una de las dos diluciones a las monocapas celulares, las cuales deben ser creadas 24 horas antes. Luego, inocular, al menos, 2 cm² de la monocapa celular sin el medio de cultivo con 100 µL de cada una de las diluciones.
- ii) Dejar reposar por 0,5 a una hora, a una temperatura de 10-15°C, para permitir la absorción y, sin retirar la inoculación, agregar el medio de cultivo celular tamponado a un pH de 7,6 y suplementado con suero fetal de becerro al 2% (FCS) (1 mL/pozo para las placas de cultivo celular de 24 pozos) e incubar a 15°C.

➤ **Monitoreo de la incubación**

- i) Observar el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados, a través del análisis microscópico a 40X-100X de magnificación, por un período de 7 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fase.
- ii) Durante la incubación, mantener el pH del medio de cultivo celular entre 7,3 y 7,6. Esto se puede lograr agregando un tampón de bicarbonato estéril (para cerrar herméticamente los recipientes de cultivo celular) o una solución tamponada de 2M Tris (para las placas de cultivo celular) al medio inoculado de cultivo celular o, mejor aún, utilizar un medio tamponado HEPES (HEPES = N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-ácido etanosulfónico).

En el caso que se presente ECP en los cultivos celulares inoculados con las diluciones del homogeneizado, realizar inmediatamente los procedimientos de identificación de IPNV.

Si luego de siete días de incubación, no se presenta el ECP (exceptuando los cultivos celulares de control positivo), realizar un subcultivo de los cultivos celulares inoculados.

➤ **Procedimientos de subcultivo**

- i) Someter las monocapas de cultivo celular a un ciclo de deshielo.
- ii) Realizar un pool de las alícuotas de los sobrenadantes de todas las monocapas celulares inoculadas con la dilución de los homogenizados de órganos.
- iii) Diluir 1/20 y 1/100 e inocular las monocapas celulares según lo ya descrito.
- iv) Incubar a 15°C y monitorear como se describió anteriormente

Si no se presenta el ECP, declarar negativa la prueba. Si se presenta el ECP, realizar inmediatamente los procedimientos de identificación de IPNV.

II.2.1.b) Identificación del IPNV aislado en cultivo celular

➤ **Test de Neutralización**

- i) Diluir el fluido que contiene el virus a 10^{-2} y 10^{-4} .
- ii) Mezclar las alícuotas de cada dilución con volúmenes iguales de una solución de anticuerpo de neutralización (NAb) contra los serotipos nativos del IPNV conocidos en la región. Luego, mezclar las alícuotas de cada dilución con volúmenes iguales de una solución de una mezcla NAb contra todos los serotipos de IPNV. De la misma forma, tratar las alícuotas de cada dilución de virus con el medio de cultivo celular. Paralelamente, realizar una prueba de neutralización para el IPNV homólogo (prueba de neutralización positiva). (El título de la solución de NAb debe ser al menos de 2000 para una reducción de la placa de 50%).
- iii) En forma paralela, se debe realizar pruebas de neutralización para:
 - ❖ una cepa homóloga del virus (test de neutralización positiva)
 - ❖ una cepa heteróloga del virus (test de neutralización negativo)
- iv) Incubar todas las mezclas a 15°C por una hora.
- v) Traspasar todas las alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a las monocapas celulares (inocular dos cultivos celulares por dilución).
- vi) Incubar a 15°C.

- vii) Revisar los cultivos celulares para detectar el inicio del ECP y registrar los resultados al momento que se presenten en los controles no neutralizados, ya sea por un simple análisis microscópico (preferentemente de contraste de fase) o después de desechar el medio de cultivo celular y teñir las monocapas celulares con una solución de violeta de cristal al 1% en etanol al 20%.
- viii) La identificación del virus sometido a prueba (como IPNV) se produce cuando no se produce o retarda el ECP en los cultivos celulares que recibieron la suspensión de virus tratada con un anticuerpo específico de IPNV. Por otra parte, el ECP es evidente en todos los otros cultivos celulares.
- ix) En el caso que se desarrolle el ECP en la presencia de un antisuero contra los serotipos nativos de IPNV, repetir la prueba de neutralización utilizando una mezcla de anticuerpo contra un serotipo no nativo de IPNV.

➤ **IFAT**

- i) Preparar las monocapas de las células en pozos de 2 cm² en placas plásticas de cultivo celular o sobre cubreobjetos, hasta alcanzar cerca de un 80% de confluencia, la cual se logra dentro de 24 horas de incubación a una temperatura de 22°C (sembrar 6 monocapas celulares por cada aislamiento de virus a ser identificado. Además, sembrar dos para los controles positivos y dos para los negativos). Es posible reducir el contenido de FCS del medio de cultivo celular a 2-4%.
- ii) Inocular las suspensiones de virus que desee identificar realizando diluciones en base 10 directamente a los pozos de cultivo celular, una vez que las monocapas estén listas para ser infectadas (el mismo día o el día después de la siembra).
- iii) Diluir la suspensión viral de control de IPNV de la misma forma, para así poder obtener una titulación del virus de cerca de 5000-10.000 unidades de formación de placa (PFU)/mL en el medio de cultivo celular.
- iv) Incubar a 15°C por 24 horas.
- v) Extraer el medio de cultivo celular, enjuagar una vez en solución tamponada de fosfato de 0,01 M (PBS), con pH 7,2, y, posteriormente, enjuagar 3 veces en acetona fría

- (almacenada a -20°C) para los cubreobjetos o en una mezcla de acetona 30%, etanol 70%, también a -20°C , para los pozos plásticos.
- vi) Dejar que el fijador actúe por 15 minutos. El volumen adecuado para 2 cm^2 de monocapa celular es de 0,5 mL.
 - vii) Dejar secar las monocapas por lo menos por 30 minutos y procesar inmediatamente o congelar a -20°C .
 - viii) Preparar una solución de anticuerpo o suero purificado para IPNV en 0,01 M PBS, pH 7,2, que contenga Tween 80 al 0,05% (PBS-T), de acuerdo a la dilución apropiada (establecida anteriormente o proporcionada por el fabricante del producto).
 - ix) Rehidratar las monocapas celulares secas, realizando 4 enjuagues con solución de PBS-T y extraer completamente este tampón después de terminado el último enjuague.
 - x) Tratar las monocapas celulares con la solución de anticuerpo por una hora, a una temperatura de 37°C en una cámara húmeda. Evitar que se produzca evaporación. Utilizar un volumen de solución de 0,25 mL. por pozo de 2 cm^2 .
 - xi) Enjuagar con PBS-T tal como se explicó anteriormente.
 - xii) Tratar las monocapas celulares, por una hora, a 37°C , con una solución de anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para la inmunoglobulina (Ig) utilizada en la primera capa y preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos FITC corresponden generalmente a anticuerpos de conejos o cabras.
 - xiii) Enjuagar 4 veces con PBS-T.
 - xiv) Analizar inmediatamente las monocapas celulares en las placas plásticas o montar los cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol con un pH de 8,5 antes de analizar en el microscopio.
 - xv) Analizar bajo luz UV incidente, utilizando un microscopio con ocular 10X y lentes de objetivo 20-40, los cuales deben poseer una alta apertura numérica. Los controles negativos y positivos deben arrojar los resultados esperados antes de realizar cualquier otro análisis.

➤ **ELISA**

- i) Cubrir los pozos de las microplacas diseñadas para ELISA con las diluciones apropiadas de la Ig específica purificada para IPNV, en un tampón de carbonato de 0,02 M con pH 9,5 (200 µL/pozo). Se puede utilizar una Ig policlonal o monoclonal de conejo o ratón. Utilizar anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos para ciertos dominios de la proteína de la capsida para lograr la identificación del IPNV.
- ii) Incubar toda la noche a 4°C.
- iii) Enjuagar dos veces con PBS al 0,01 M.
- iv) Bloquear con albúmina de suero bovino (1,5% en tampón de carbonato) o cualquier otra solución bloqueadora, por un período de una hora, a 37°C (300 µL/pozo).
- v) Enjuagar 4 veces en un PBS que contenga Tween 20 al 0,05% (PBS-T).
- vi) Agregar un volumen igual de PBS-T a la suspensión de virus que desea identificar.
- vii) Colocar 100 µL/pozo de la segunda o cuarta dilución de la suspensión del virus a identificar, del cultivo celular no infectado (control negativo) y del virus de control de IPNV (control positivo). Dejar actuar con el anticuerpo cubierto para el IPNV por un período de 30 minutos, a 37°C.
- viii) Enjuagar 4 veces con PBS-T. Entre cada enjuague, dejar decantar por 3 minutos.
- ix) Agregar a los pozos un anticuerpo policlonal o un MAb para IPNV conjugado con peroxidasa de rábano (HRPO) conjugada para IPNV. También es posible agregar IgG policlonal para IPNV o MAb para una proteína específica de capsida para así obtener un dominio diferente al del MAb de cobertura y previamente conjugado con biotina.
- x) Incubar por 30 minutos, a una temperatura de 37°C.
- xi) Enjuagar y lavar con PBS-T, tal como se explicó en el paso viii).
- xii) Agregar 200 µL de estreptavidina o ExtrAvidin (Sigma) conjugada con HRPO a los pozos a los que se les agregó el anticuerpo conjugado con biotina y repetir los pasos x) y xi).
- xiii) Agregar 200 µL del substrato cromógeno. Detener el curso de la prueba cuando reaccionen los controles positivos y ver los resultados.

➤ **RT-PCR**

1. Extracción del Acido Nucléico

- i) Incubar las muestras de virus (100 μ L de fluidos extraídos de cultivos celulares infectados) en 400 μ L de tampón de lisis (sulfato dodecil de sodio, SDS, al 1%; 0,15M NaCl, 1,25 mM EDTA, 0,1 M Tris,HCl [pH7,5]) y 6,75 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) por un período de 3 horas, a 37°C.
- ii) Agregar un volumen de fenol-cloroformo (1:1), mezclar los contenidos y centrifugar la mezcla a 10.000 x g, por un período de 5 minutos.
- iii) Recuperar la capa acuosa y mezclar con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.
- iv) Mantener las muestras por toda la noche a -20°C y, luego, centrifugar a 15.000 x g, por un período de 30 minutos.
- v) Extraer los pellets de ácido nucleico utilizando etanol al 70%, dejar secar y volver a suspender en 10 μ L de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 7,5]).
- vi) Almacenar a -70°C.

2. Síntesis del cDNA

- i) Calentar las muestras por 5 minutos a 95°C, enfriar en hielo y centrifugar por un período breve (5 seg) a 10.000 x g.
- ii) Agregar 3 μ L de cada muestra de ARN a 17 μ L de una mezcla reactante que contenga 5 mM MgCl₂, 1 mM (cada uno) de trifosfatos dioxidoribonucleótido, 40 U de RNAsin, 1,25 mM de primer hexamero aleatorio y 200 U de virus de leucemia Moloney Murine RT en un tampón de PCR libre de Mg (Promega, Inc., Madison, Wis.).
- iii) Mezclar los contenidos del tubo e incubar la mezcla a 37°C, durante una hora.

3. PCR

- i) Utilizar un protocolo único de PCR con los cuatro sets de primers.
- ii) Calentar las muestras por 5 minutos, a una temperatura de 95°C y enfriar en hielo.
- iii) Realizar el PCR en un volumen total de 100 µL de tampón de PCR que contenga 2 mM MgCl₂, 42 pmol de cada primer y 2,5 U de *Taq* polimerasa.
- iv) Luego de agregar 70 µL de aceite mineral para evitar la evaporación, someter las muestras a 35 ciclos (desnaturalización por 30 seg a 94°C, anillamiento por 30 seg, a 58°C y una extensión de un minuto a 72°C) en un termociclador.

Primers para IPN según Blake et al., 1995

PrA ₁	5'-TGAGATCCATTATGCTTCCAGA-3'
PrA ₂	5'-GACAGGATCATCTTGGCATAGT-3'
PrB ₁	5'-GCCGACATCGTCAACTCCAG-3'
PrB ₂	5'-GACAGGATCATCTTGGCATA-3'
PrC ₁	5'-AAAGCCATAGCCGCCCATGAAC-3'
PrC ₂	5'-ATCCTGGTTTGACCACTCATAAC-3'
PrD ₁	5'-AAAGCCATAGCCGCCCATGAAC-3'
PrD ₂	5'-TCTCATGAGCTGGCCAGGTAC-3'

II.2.1.c) Identificación del IPNV aislado desde tejidos del pez

➤ IFAT

- i) Desangradar el pez.
- ii) Realizar improntas de riñón en portaobjetos limpios o en el fondo de los pozos de una placa plástica para cultivo celular.
- iii) Almacenar los trozos de riñón junto con otros órganos necesarios para el aislamiento del virus (esto en caso que sea necesario más adelante).
- iv) Dejar secar la impronta por 20 minutos.

- v) Fijar con acetona o etanol/acetona y secar como se explicó en IFAT de II.2.1.b)
- vi) Rehidratar las preparaciones anteriores y bloquear con leche descremada al 5% o albúmina de suero bovino al 1% en PBS-T, por un período de 30 minutos, a 37°C.
- vii) Enjuagar cuatro veces con PBS-T.
- viii) Tratar las improntas con la solución de anticuerpo para IPNV y enjuagar como se explicó IFAT de II.2.1.b)
- ix) Bloquear y enjuagar siguiendo el procedimiento descrito en los pasos vi) y vii).
- x) Revelar la reacción utilizando el anticuerpo específico apropiado de conjugado de FITC, enjuagar y analizar como se explicón los pasos xii)-xv) , IFAT de II.2.1.b)

Si el resultado es negativo, procesar las muestras de órganos almacenadas a 4°C destinadas al aislamiento de virus en cultivo celular, siguiendo el procedimiento descrito para realizar la identificación en cultivos celulares.

➤ **ELISA**

- i) Separar una alícuota de ¼ de cada homogenizado, para el caso que sea necesario realizar el aislamiento de virus en cultivo celular.
- ii) Agregar al homogenizado un volumen de 100 mM de fluoruro de fenil metil sulfónido (PMSF) para obtener una concentración final de 2 mM de PMSF. Mezclar suavemente.
- iii) Completar el procedimiento siguiendo los pasos descritos en ELISA de II.2.1.b)

Si los resultados de la prueba son negativos, procesar las muestras de órganos destinadas al aislamiento del virus en cultivo celular y que fueron almacenadas a 4°C, siguiendo el procedimiento descrito para el aislamiento en cultivo celular.

➤ **RT-PCR**

Se procede en forma análoga a lo descrito para RT-PCR en II.2.1.b), teniendo en cuenta que, en este caso, las muestras de virus provienen de homogenizados de muestras clínicas.

II.2.2. Anemia Infecciosa del Salmón (ISA)⁴

La anemia infecciosa del salmón es una enfermedad causada por un virus del tipo *Orthomyxo*. El salmón del Atlántico (*Salmo salar*) es la única especie susceptible que se sabe desarrolla la enfermedad; la trucha arcoiris y la trucha cabeza de acero (*Oncorhynchus mykiss*) han mostrado experimentalmente actuar como vectores asintomáticos del agente infeccioso.

Hasta ahora, existen informes sobre su presencia en Canadá (New Brunswick y Nova Scotia), Noruega, Islas Faroe y el Reino Unido (Escocia y las Islas Shetland).

Los procedimientos de diagnóstico de ISAV actuales están basados en cambios clínicos, histopatológicos y hematológicos, detección de ISAV a través del cultivo del virus o la detección del virus a través de una prueba indirecta de anticuerpos inmunofluorescentes, la cual se puede utilizar para confirmar la presencia de un antígeno viral en las lesiones típicas y solucionar los casos que presentan signos no decisivos de la enfermedad. Recientemente, se han desarrollado métodos de detección de los nucleótidos específicos de ISAV, a través de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

II.2.2.a) Aislamiento del ISAV en líneas celulares

Se ha establecido una línea celular (SHK-1) susceptible a ISAV desde el riñón anterior del salmón Atlántico. Se ha realizado una propagación de ISAV en otras líneas celulares, tales como AS y CHSE-214. La línea celular SHK-1 se cultiva a 20°C en un medio de cultivo celular L-15 de Leibovitz complementado con suero bovino fetal (5%), L-glutamine (4mM), gentamicina (50 µg/mL) y 2-mercaptoetanol (40 µM). Se desarrolla un efecto citopático (CPE) después de la inoculación con tejido homogenizado (10%, w/v), luego de incubar por 10-14 días a 15°C o luego de una serie de trasposos de un medio de cultivo celular a nuevos cultivos celulares. La apariencia del ECP típico es de células vacuolizadas que más tarde se reúnen y desligan de la superficie de crecimiento.

⁴ Adaptación de OIE, 2000

II.2.2.b) Identificación del ISAV aislado en cultivo celular

La identificación del virus aislado se puede realizar a través de la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT), utilizando como anticuerpo primario uno monoclonal anti-ISAV (Mab) o mediante la técnica RT-PCR.

II.2.2.c) Identificación del ISAV aislado desde tejidos del pez

➤ IFAT

- i) Fijar los portaobjetos, por 3 minutos, en metanol/acetona (1:1) y dejar secar.
- ii) Antes de comenzar con la tinción, analizar cada portaobjeto y delimitar las regiones apropiadas del portaobjeto utilizando un lápiz ImmEdge®. Dejar secar.
- iii) Colocar los portaobjetos en una solución bloqueadora (leche descremada al 6%) e incubar $\mu\text{Ac}/\text{mL}$ agitando levemente a temperatura ambiente, por 30 minutos.
- iv) Enjuagar cada portaobjeto con PBS y colocarlos horizontalmente en un contenedor de portaobjeto que contenga papel mojado para así mantener la atmósfera húmeda.
- v) Cubrir cada impronta con una solución anticuerpo monoclonal 3H6F8 para ISAV y cerrar la caja.
- vi) Incubar por 60 minutos, agitando levemente, a temperatura ambiente. Generalmente, el anticuerpo se diluye desde 1:10 a 1:100 en leche descremada al 1%; no obstante, es necesario determinar la dilución real para cada lote.
- vii) Lavar 3 veces los portaobjetos con PBS-T al 0,1% (PBS-T), por un período de 2 minutos.
- viii) Cubrir cada impronta con una solución que contenga conjugado de FITC de cabra antiratón, diluido en leche descremada al 1% e incubar en un ambiente húmedo, por un período de 60 minutos, a temperatura ambiente.
- ix) Lavar 3 veces los portaobjetos con PBS-T al 0,1%, por un período de 2 minutos.
- x) Cubrir cada portaobjeto con solución CITIFLUOR® (500 μl de CITIFLUOR® mezclado con 1,5 mL de Tween 20 al 0,2% (v/v) en PBS) durante 10 minutos.
- xi) Lavar los portaobjetos tres veces con PBS-T al 0,1%.
- xii) Cubrir cada impronta con yoduro de propidio (propidium iodide) en PBS-T al 0,1% e incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- xiii) Lavar 3 veces los portaobjetos con PBS-T al 0,1%, por 2 minutos.

- xiv) Decantar los portaobjetos y montarlos en CITIFLUOR®.
- xv) Almacenar en la oscuridad a 4°C, antes de someterlos a análisis microscópico.

Incluir 4 tipos de controles para cada lote de portaobjetos con tinción para IFAT:

- ❖ Impronta de riñón de un salmón Atlántico no infectado (control negativo).
- ❖ Impronta de riñón de un salmón Atlántico infectado con ISAV (control positivo).
- ❖ Cultivo celular SHK-1 no infectado (control negativo).
- ❖ Cultivo celular SHK-1 infectado con ISAV (control positivo).

En el caso que se obtenga un resultado positivo en cualquiera de los controles negativos, considerar inválida la prueba para todos los portaobjetos del lote. Si todos los portaobjetos del lote, incluyendo los controles positivos, arrojan resultados negativos, considerar la prueba inválida para todos los portaobjetos del lote. En aquellos casos en que defectos en los controles invalidan un lote de portaobjetos, destruir los portaobjetos y realizar otra prueba utilizando improntas duplicadas.

➤ **RT-PCR**

La amplificación de parte del segmento 8 del genoma ISAV se puede llevar a cabo en el tejido de un pez o ISAV en cultivo, utilizando el método de Mjaaland et al. 1997.

1. Extracción de ARN

- i) Extraer el RNA later de cada muestra. Agregar 1mL de dH₂O tratada con DEPC a cada tubo y centrifugar los tubos al 13.000 rpm por 5 minutos, a una temperatura de 4°C.
- ii) Extraer el sobrenadante de cada muestra y agregar 800 µL de TRIzol (Life Technologies) a cada muestra y crear un tubo de control que contenga el material de control adecuado (400 µL de dH₂O o homogenizado de riñón de un pez específico libre del patógeno).

- iii) Incubar los tubos a temperatura ambiente, por 54 minutos. Agregar 160 μL de cloroformo a cada tubo y mezclar por 3 minutos. Luego, centrifugar a 13.000 rpm por 15 minutos a una temperatura de 4°C.
- iv) Extraer la capa superior acuosa y colocarla en un tubo rotulado de microcentrífuga de 1,5 mL que contenga 500 μl de isopropanol e incubar los tubos, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Luego, centrifugar a 6.500 rpm por 5 minutos, a una temperatura de 4°C.
- v) Extraer el sobrenadante y agregar 1 mL de etanol al 75% a un pellet de ARN. Luego, centrifugar a 6.500 rpm por 5 minutos, a 4°C.
- vi) Extraer el sobrenadante y dejar los tubos abiertos por aproximadamente 3 minutos para permitir que se evapore el etanol restante. Agregar 15 μL de dH_2O tratada con DEPC para resuspender los sedimentos; agitar si es necesario.
- vii) Utilizar un espectrofotómetro para calcular la concentración de ARN y purificación de las muestras. Medir las densidades ópticas a 260 y 280 nm.
- viii) El ARN que se va a utilizar inmediatamente (el mismo día), se puede almacenar, en forma temporal, a 4°C. Almacenar a -80°C el ARN que no se utilizará inmediatamente.

2. Transcripción reversa

- i) Diluir 2 μg de ARN en dH_2O tratada con DEPC en tubos de microcentrífuga de 1,5mL. En el caso que la concentración de ARN de la muestra sea demasiado baja para permitir el uso de 2 μg en la reacción RT, utilizar la cantidad máxima posible de ARN. Incubar el ARN diluido a 55-60°C por 10 minutos.
- ii) Luego, colocar los tubos con ARN en hielo y agregar reactivos RT para lograr las concentraciones finales de 1 x tampón, 1 mM dNTPs, 100 ng hexámeros aleatorios, 20U de inhibidor de RNase y 200 MMLV-RT en un volumen total de 20 μL .
- iii) Incubar los tubos a 37°C por una hora.
- iv) Almacenar el cADN a 4°C hasta que sea necesario y utilizarlo en el PCR tan pronto como sea posible.

3. PCR

- i) Agregar 5 μL de cADN a 45 μL de mezcla de PCR para lograr concentraciones finales de 1 x tampón, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM para cada dNTP, 25pmol para cada primer y 1 U de Taq polimerasa. Los primers son ISA+ (5'-GGCTATCTACCATGAACGATT-C-3') (primer directo) y ISA- (5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3') (primer reverso). Incluir controles negativos para la extracción y los pasos de RT y PCR.
- ii) Colocar los tubos en un termociclador e incubar a 94°C por 5 minutos. Luego, realizar 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por un minuto. Finalmente, incubar a 72°C por 5 minutos.
- iii) Determinar los resultados del PCR luego de la electroforesis, utilizando gel de agarosa al 2 % con tinción de bromuro de etidio e incluir marcadores de tamaño en todas las muestras. Considerar un solo producto de PCR como prueba de la presencia de ISAV. Además, considerar que las muestras que contengan un producto adicional (310 pb), también presentan ARN de ISAV. Por otra parte, las muestras que presentan múltiples productos de PCR, incluyendo alguno de aproximadamente 155 pb, también pueden presentar ISAV. Todo esto se puede analizar más profundamente utilizando pruebas de ADN o secuenciación nucleotídica.

❖ Confirmación a través de la prueba de ADN.

La especificidad del producto de 155 bp de PCR se puede lograr practicando una prueba utilizando un oligonucleótido que tiene la capacidad de hibridizarse en una región del producto del PCR, que se encuentre al interior de los primers.

- ⇒ Someter los productos del PCR a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con marcadores de tamaño y un control positivo.
- ⇒ Transferir el ADN hacia una membrana (Southern blott) e incubar el oligonucleótido (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGAAGGTG-3') marcado, junto con la membrana.
- ⇒ Eliminar las pruebas no enlazadas o enlazadas no específicamente de la membrana y visualizar la prueba enlazada.

⇒ Si la prueba se enlaza a un fragmento de 155bp (y se observa 310bp) significa que existe especificidad del PCR y, además, indica la presencia de ARN de ISAV en la muestra.

❖ **Secuenciación de los productos de PCR.**

La especificidad del PCR se puede lograr a través de un análisis de la secuencia nucleotídica del producto 155 bp del PCR.

⇒ Purificar el producto del PCR para extraer el gel o solución de agarosa.

⇒ Secuenciar el fragmento utilizando los mismos primers utilizados en el PCR.

⇒ Comparar la secuencia nucleotídica con el segmento 8 de ISAV disponibles en la base de datos de la secuencia nucleotídica de EMBL (números de acceso Y10404, AJ012285, AJ242016).

⇒ La presencia de una secuencia que corresponda al segmento 8 de ISAV demuestra la presencia de ARN de ISAV en la muestra.

III. ENFERMEDADES BACTERIANAS

III.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

III.1.1. Manipulación de las muestras

Si se trata de alevines pequeños una posibilidad es enviar los peces vivos en una bolsa plástica con suficiente aire y recubierta con hielo, en una caja térmica. Si no se puede optar por la posibilidad anterior, mantener las muestras refrigeradas (4°C) y trasladarlas dentro de bolsas plásticas cubiertas con hielo, en una caja térmica.

Se debe tener presente que los exámenes en la muestra fresca o refrigerada, deben comenzar dentro de un plazo máximo de 6 horas posterior a la toma de la muestra..

- Registrar y analizar los signos externos de las branquias, ojos y boca.
- Limpiar y abrir los peces en forma aséptica.
- Sembrar en medios de cultivos bacteriológicos el material procedente de lesiones externas e internas. Siempre sembrar desde el riñón.
- Es posible emplear una variedad de medios a elección del laboratorio que realice los análisis, pero los medios que básicamente se utilizan para los aislamientos primarios son:
 - TSA (Agar de Soya Trípica)
 - TSA+NaCl (*peces marinos*)
 - Agar SHIEH, Agar Cytofaga o Agar MAOA (Flavobacterias)
 - KDM-C o KDM-2
 - Mac Conkey

En el Anexo I de este manual se describe la preparación de estos medios. Incubar a 20°C las siembras en los diferentes medios y observar, durante 5 días, para detectar la presencia de crecimiento antes de eliminarlas. En el caso de los medios KDM-C o KDM-2, incubar por 15 días. Analizar en forma bioquímica los crecimientos de colonias obtenidos de las siembras para, así, identificar las bacterias.

Paralelamente a la siembra en los medios, realizar frotis del riñón, de las lesiones externas de branquias y sangre, para su posterior análisis al microscopio. Se recomienda realizar por lo menos

4 frotis de riñón para estudio microscópico, incluyendo las pruebas inmunológicas del anticuerpo fluorescente (FAT). Realizar la tinción de los frotis utilizando la tinción adecuada al patógeno sospechoso y observar bajo microscopio óptico, un mínimo de 50 campos con aumento de 900 a 1000 X.

Si se observan lesiones granulomatosas (en los órganos), se recomienda realizar frotis de estas lesiones y teñirlos utilizando el método *de* Ziehl-Nielsen.

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

III.1.2. Procedimientos de detección e identificación

Para la siembra en los diferentes medios determinativos, se toma con el asa bacteriológica, esterilizada al calor, una cantidad apropiada de bacterias desde una colonia pura y se siembra por estrías 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.

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

En el caso de los crecimientos en Agar específico para flavobacterias, Agar SHIEH, Citofaga u otros, aislar las colonias amarillo-rizoides que han crecido y realizar un frotis para Tinción Gram. Si se observan bacilos Gram negativos, alargados, delgados y con motilidad positiva, se puede suponer una infección por *Flavobacteria*. Para confirmar este diagnóstico, es necesario realizar el procedimiento bioquímico.

III.1.3. Procedimientos de Identificación Confirmatoria

La identificación de las bacterias a través de las pruebas bioquímicas, es considerada como un diagnóstico presunto. Para obtener un diagnóstico confirmatorio o positivo del patógeno, se debe aplicar métodos inmunológicos adecuados.

La elección del método a emplear, depende del objetivo buscado por el laboratorio y por la rapidez con que se requieren los resultados. El objetivo puede ser

- Diagnóstico de una infección clínica (prioriza la rapidez)
- Descubrimiento de portadores (prioriza la sensibilidad)
- Caracterización de agentes infecciosos (prioriza la seguridad más la información).

El Cuadro N° 26 del documento principal de este informe, resume la sensibilidad de los métodos inmunológicos. Se puede señalar que, frente a los métodos que se citan para cada patógeno, las técnicas disponibles, en orden decreciente, son:

- Prueba ELISA (0.008-0.008 $\mu\text{Ac}/\text{mL}$)⁵
- Aglutinación (0.08-0.4 $\mu\text{Ac}/\text{mL}$)
- IFAT (8.0 $\mu\text{Ac}/\text{mL}$)

➤ Test de la Aglutinación Bacteriana

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

- i) 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).
- ii) Colocar una pequeña gota de suspensión de bacterias en un portaobjetos excavados y, como control negativo, colocar una suspensión de otras bacterias.
- iii) Agregar una gota de antisuero diluido 1:10 a cada suspensión de bacterias. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente.
- iv) Analizar macroscópicamente a varios intervalos para observar la reacción.

⁵ Ac : cantidad más pequeño de anticuerpo requerida para dar una reacción positiva en presencia del antígeno

v) Es posible analizar el resultado con poco aumento microscópico. Generalmente, se registra el tiempo de aglutinación visible. Una aglutinación fuerte debería ocurrir dentro de 5 minutos.

vi) Registrar los resultados de la siguiente forma:

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

➤ **Técnica de anticuerpos de fluorescencia indirecta (IFAT)**

Técnica de doble capa para la identificación de un patógeno específico. En la primera capa, utilizar un anticuerpo específico preparado en conejo. En la segunda capa, utilizar un anticuerpo de cabra marcado con una tinción de fluorescencia contra un IgG de conejo. La ventaja de esta técnica es la posibilidad de obtener el anticuerpo marcado de fuentes comerciales y, además, la persona encargada del diagnóstico no se involucra en los procedimientos de la conjugación (Abbas et al, 1997).

- i) Preparar portaobjetos limpios y colocar el antígeno desconocido o frotis de tejido en el área circular del portaobjeto, dispersando una capa fina.
- ii) Secar en un horno o incubador por 5 minutos a una temperatura de 60°C (o fijar en metanol por 5 minutos).
- iii) Agregar una gota de antisuero de conejo no marcado específico al antígeno deseado que teóricamente se encuentra sobre el frotis.
- iv) Realizar controles positivos y negativos del suero en frotis idénticos.
- v) Incubar a temperatura ambiente por un período de 5 minutos.
- vi) Enjuagar los portaobjetos utilizando PBS (pH 7,2) y colocarlos en una gradilla apropiada en un baño de PBS, por un período de 5 minutos.
- vii) Dejar secar los portaobjetos.
- viii) Agregar inmunoglobulina de cabra anti suero de conejo marcada con FITC.
- ix) Volver a incubar y enjuagar como se explicó anteriormente.

- x) Secar los portaobjetos utilizando toalla de papel absorbente.
- xi) Agregar fluido de montaje a pH 9,0 directamente a la muestra. Colocar un cubreobjeto en la muestra y observar al microscopio, con aceite de inmersión.
- xii) Detectar la presencia de fluorescencia positiva (color verde manzana). Los datos pueden estar basados en la intensidad o cantidad de partículas fluorescentes.
- xiii) Almacenar los portaobjetos en oscuridad a 4 °C

➤ **Prueba Inmunoenzimática (ELISA)**

La técnica llamada ELISA (debido a las iniciales de Enzyme-linked immunoabsorbent assay) utiliza los anticuerpos a los que se han enlazado covalentemente las enzimas. Es una técnica inmunológica ampliamente utilizada. La unión covalente de enzimas a las moléculas de anticuerpos sin alterar las propiedades catalíticas de éstas y la especificidad del anticuerpo produce una herramienta inmunológica que posee alta sensibilidad y alta especificidad.

Se han desarrollado dos metodologías básicas de ELISA, una para detección del antígeno (**ELISA directo**) y otra para anticuerpos (**ELISA indirecto**). Se describe el procedimiento para ELISA directo que es el método utilizado para detectar patógenos de peces. En dicho procedimiento el antígeno queda atrapado entre dos capas de anticuerpos, el segundo anticuerpo contiene una enzima conjugada y es también específico para el antígeno

- i) Cubrir los pozos de la microplaca para ELISA con 100 µL de una dilución apropiada de inmunoglobulina de conejo purificada específica para el antígeno deseado, en una cubierta de tampón alcalino, (pH 9,6) 0,05M, tal como tampón boro o carbonato.
- ii) Incubar las placas a 4°C durante 16 horas o toda la noche.
- iii) Lavar cuatro veces con 0,01 M PBS conteniendo 0,05% Tween 20 pH 7,2 (PBS-T).
- iv) Bloquear con leche descremada (5% en PBS-T) u otra solución bloqueadora por 30 minutos a 22 °C.
- v) Lavar cuatro veces con PBS-T
- vi) Colocar 100 µL/pocillo de la solución conteniendo la bacteria para identificación y la bacteria control, dejar reaccionar con la cubierta de anticuerpos por 60 a 90 minutos a 22°C.

- vii) Lavar cuatro veces con PBS-T. Colectar el fluido desechado y autoclavar antes de eliminar.
- viii) Agregar a los pozos 100 μ L de una dilución apropiada (en PBS más Tween 20 al 0,05%) de un segundo anticuerpo, usualmente anticuerpos para el antígeno específico extraído de cabra. Este puede o no ser conjugado a biotina. Dejar actuar por 60 a 90 minutos a 22 °C.
- ix) Lavar cuatro veces con PBS-T.
- x) Agregar el substrato cromógeno. Detener el curso del ensayo cuando el control reacciona positivo, lo que se puede lograr añadiendo 100 μ L de ácido sulfúrico 3N a cada pocillo. Leer los resultados.

Las muestras positivas se reconocen a simple vista por el cambio de color. Sin embargo para que no pase inadvertida ninguna muestra positiva, es preciso leer por espectrofotometría (en un lector ELISA) la absorbancia del pozo de la microplaca a 492 nm. Se consideran positivos todos los pozos cuya absorbancia sea mayor que el doble de la absorbancia media de los pozos negativos de control, presentes en la misma placa.

III.2. PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS

III.2.1. Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD)

La enfermedad bacteriana del riñón (BKD) es una enfermedad infecciosa típicamente crónica, de curso prolongado y una naturaleza insidiosa, provocada por una bacteria coryneforme Gram positiva, que es la única especie perteneciente al género *Renibacterium*. Esta enfermedad se ha presentado desde Norteamérica, Japón, Europa Oriental y Chile y tiene importancia económica para los salmónidos de cultivo, especialmente para los peces del género *Oncorhynchus* (Salmón del Pacífico).

El diagnóstico depende del incremento de la mortalidad, cambios clínicos y patológicos clásicos asociados con la enfermedad, y el aislamiento de *Renibacterium salmoninarum* en medio de cultivo enriquecido con cisteína (KDM2) o en el medio selectivo SKDM desde lesiones o ejemplares portadores del patógeno.

III.2.1.a) Aislamiento

Renibacterium salmoninarum es un organismo de crecimiento lento que requiere una prolongada incubación (2-3 semanas, algunas veces más, a 15°C) para producir colonias. Para su crecimiento requiere Cisteína y suero o sustitutos de suero. Se han propuesto diferentes medios o ingredientes para mejorar su crecimiento y reducir el desarrollo de microorganismos asociados. Los dos medios especiales que generalmente se utilizan son:

- Medio enriquecido con suero (KDM2) o carbón (KDMC)
- Medio selectivo (SKDM)

La suplementación del medio KDM2 con antibióticos puede reducir el problema de rápido crecimiento de otros organismos (bacterias y hongos), sin embargo, también puede inhibir a la *R. salmoninarum*. Otra posibilidad, es analizar las placas regularmente a intervalos de 2 - 3 días y extraer, asépticamente, las colonias producidas por organismos de rápido crecimiento. Para mantener la viabilidad de *R. salmoninarum*, se recomienda la preparación de suspensión de tejido en sal isotónica (0,9% w/v) enriquecido con peptona (0,1% w/v).

Después de un período suficientemente largo de incubación en KDM2, KDMC o SKDM, *R. Salmoninarum* produce colonias con apariencia redondeada, pequeña, lisa y blanca cremosa

de 2 mm de tamaño. Las bacterias aisladas desde peces enfermos producen colonias después de 2-3 semanas en promedio, sin embargo, se han observado casos en los cuales el crecimiento inicial ha tardado hasta 8 semanas en KDM2 y 12 semanas sobre el medio selectivo SKDM.

R. salmoninarum aparece como un bacilo pequeño (0,3-1,5 x 0,1-1 μm), Gram positivo, PAS positivo, asporongenous, no mótil, no ácido-resistente, frecuentemente en pares, cadenas cortas o formas pleomórficas como letras chinas, especialmente en el tejido de peces.

R. salmoninarum es catalasa positiva y oxidasa negativa. Su característica fenotípica ha sido establecida usando el sistema API-Zym y pruebas convencionales. Sin embargo, el lento crecimiento del organismo no logra, en la práctica, que estas pruebas sean muy exitosos. Los métodos serológicos son usualmente empleados para confirmar la identidad de la cepa aislada.

III.2.1.b) Detección e identificación por métodos serológicos.

Aunque han sido reportados algunos riesgos de reacción cruzada con otras bacterias, la homogeneidad antigénica de *R. salmoninarum* es una característica que favorece el uso de antisuero específico en los procedimientos de identificación. Tales técnicas se han aplicado para la detección directa de *R. salmoninarum* en peces infectados y se favorecen por la existencia de un factor antigénico soluble, estable al calor, abundantemente liberado en tejido infectado. El más importante de estos productos se denomina proteína p57, debido a su peso molecular de 57 Kd..

Las pruebas rápidas inmunológicas son de amplia aplicación en monitoreos de brotes de la enfermedad y análisis de los reproductores para seleccionar a los peces aparentemente no infectados para propósitos de reproducción, los procedimientos de aglutinación son ahora reemplazados por los test de FAT, IFAT y ELISA.

➤ IFAT

Los métodos de inmunofluorescencia directa (FAT) e indirecta (IFAT) han sido comúnmente usados para demostrar la presencia de la bacteria en tejidos. En el primer caso, son usadas inmunoglobulinas conjugadas de anti- *R. salmoninarum* en conejo o cabra para FITC. En el segundo caso, las inmunoglobulinas heteroespecífico son marcadas contra el suero anti- *R. salmoninarum* . Es posible adquirir los reactivos y conjugados desde fuentes comerciales, tales como BiosChile, Sigma, etc. Además, también se encuentran disponibles los kits de diagnóstico rápido (Apéndice proveedores de kits).

➤ **ELISA**

ELISA puede ser usado para la detección del antígeno soluble extraído desde el tejido infectado, y es probablemente el método más sensible. Permite testar un gran número de muestras y está especialmente bien adaptado para los requerimientos de certificación sanitaria. La técnica más común es el sándwich de doble anticuerpo: anticuerpos específicos son cubiertos sobre la superficie de poliestireno o PVC de los pozos de la microplaca, y las muestras conteniendo el antígeno, conjugado y sustrato son agregados sucesivamente.

Se han usado dos procedimientos de ELISA para antígenos solubles. Uno utiliza un antisuero policlonal que reacciona con determinantes antigénicos estables al calor, mientras los otros MAbs son usados para determinantes antigénicos sensibles al calor. El tratamiento de calor limita la reacción cruzada, pero no completamente. Los MAbs parecen ser más específicos. Las muestras pueden ser mantenidas frías o congeladas después del muestreo. Peces enfermos y subclínicamente infectados dan reacciones de ELISA que son claramente distintivas de los peces no infectados.

Los reactivos necesarios para detectar *R. salmoninarum* a través de ELISA son:

❖ **Muestra para la prueba y preparación del diluyente de control**

Solución salina tamponada de fosfato (PBS), pH 7,4 suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v) y Timerosal al 0,01% (p/v) que actuará como preservante. Para 1 litro:

NaCl	8.00 gramos
KH ₂ PO ₄	0.20 gramos
Na ₂ HPO ₄	1.09 gramos
KCl	0.20 gramos
Timerosal	0.10 gramos
pH	7.4 confirmado
Tween 20	0.5 mL

❖ **Antígeno de Control Positivo**

Células de *Renibacterium salmoninarum* (células envasadas húmedas al 0,5% (p/v)) en PBS de pH 7.4 + Timerosal. Es posible liofilizar las células bacterianas por largos períodos de almacenamiento. Normalmente, las bacterias liofilizadas contienen un compuesto portador, como por ejemplo la dextrosa, que sirve para la estabilidad.

- i) Almacenar la preparación liofilizada a 4°C. Mantener estable por lo menos por un año.
- ii) Rehidratar las bacterias liofilizadas con 1.0 mL de agua ultra pura.
- iii) Preparar las soluciones necesarias, 1:100, 1:500, 1:1.000 y 1:5.000 (v/v), en PBS-T y almacenar a -70°C.

❖ **Tampón de cobertura**

Carbonato de sodio, pH 9,6 o una solución de cobertura disponible en el comercio.

- i) Preparar tampones frescos para cada ELISA.
- ii) Carbonato de sodio, pH 9,6. Almacenar a temperatura ambiente y dejar por 30 días.

Para un litro:

Na ₂ CO ₃	1.59 gramos
NaHCO ₃	2.93 gramos
Timerosal	0.10 gramos
pH	9.6

- iii) Concentrados de soluciones de cobertura disponibles en el mercado. Almacenar el concentrado, luego de abierto, a 4°C. Generalmente, será necesario estabilizarlo por lo menos por un año. Diluir siguiendo las instrucciones del proveedor.

❖ **Anticuerpo de cobertura**

Inmunoglobulina purificada de afinidad al *R. salmoninrum*. Normalmente, cada frasco contiene 1.0 mg de inmunoglobulina liofilizada.

- i) Almacenar la preparación liofilizada a 4°C. Estable por lo menos por un año.
- ii) Rehidratar el anticuerpo de cobertura liofilizado, primero, mezclando 1.0 mL de glycerol + 1.0 mL de agua ultra pura que contenga timerosal al 0,2 % (2x); luego, transferir 1.0 mL de la solución de glicerol al 50 % para cada frasco de producto.
- iii) Rehidratar los contenidos de una cantidad suficiente de frascos para probar la cantidad anticipada de peces a muestrear, para una estación de desove dada. Agrupar los contenidos de todos los frascos y luego colocarlos en frascos para congelamiento y almacenar a -70°C.

❖ **Solución de Lavado**

PBS-T o una solución de lavado disponible en el comercio que contenga Tween 20.

- i) Preparar soluciones frescas para cada ELISA.
- ii) Preparar el PBS-T tal como se describió anteriormente.
- iii) Concentrados de Soluciones de lavado disponibles en el comercio. Almacenar el concentrado, luego de abierto, a 4°C. Generalmente, estable por lo menos por un año. Diluir siguiendo las instrucciones del proveedor.

❖ **Diluyente del Conjugado**

PBS-T o leche en polvo descremada al 2% (p/v) o un tampón de borato. Se encuentran disponibles en el comercio productos en forma de concentrados que generalmente se comercializan como diluyentes o soluciones bloqueadoras.

- i) Preparar un conjugado fresco para cada ELISA.
- ii) PBS-T. Preparar según se explicó anteriormente. Es posible sustituir la leche descremada por Tween 20, 2 gramos de leche descremada o leche al 2 % (p/v) hasta 100 mL en PBS con pH 7,4.
- iii) Concentrados de solución bloqueadora o diluyente disponible en el comercio. Almacenar el concentrado a 4°C después de abierto. Generalmente, estable por al menos un año. Diluir siguiendo las instrucciones del proveedor.

❖ **Conjugado de cabra anti-*R. salmoninarum***

Inmunoglobulina purificada de afinidad con el *R. salmoninarum* marcado con peroxidasa de rábano. Generalmente, cada frasco contiene 0,1 mg de conjugado liofilizado.

- i) Almacenar la preparación liofilizada a 4°C. Estable por lo menos por un año.
- ii) Rehidratar el anticuerpo de cobertura liofilizado, primero mezclando 2.0 mL de glicerol + 1.0 mL de agua ultra pura que contenga thimesoral de fuerza al 0,2% y luego transferir a 1.0 mL de solución de glicerol al 50% a cada producto frasco.
- iii) Rehidratar los contenidos de una cantidad suficiente de frascos para una cantidad anticipada de peces a muestrear en una estación de desove dada. Agrupar los contenidos de los frascos y luego colocarlos en varios frascos para congelamiento y almacenar a -70°C.

❖ **Sustrato de ABST-cromógeno de peroxidasa**

Se encuentran disponible productos comerciales y, generalmente, se les encuentra en sistemas que consisten en dos partes: el cromógeno ABTS, 0,6g/L 2.2'-azino-di[etilbenzotiazolina sulfinato] en un tampón de glicina y un sustrato de peroxidasa de hidrógeno, peróxido de hidrógeno al 0,02 % en un tampón de ácido cítrico.

❖ **Solución de detención**

Dodecil sulfato de sodio al 5% (v/v).

- i) Almacenar a temperatura ambiente. Estable por lo menos por un año.
- ii) Combinar 4 partes del concentrado con 1 parte del agua justo antes de usarlo.

1. Antes de realizar ELISA

- i) Preparar el reactivo.
- ii) Determinar las concentraciones de trabajo de las preparaciones de inmunoglobulina anti *R. salmoninarum*.
 - Primero, determinar las concentraciones de trabajo del anticuerpo purificado de cabra anti *R. salmoninarum* (anticuerpo de cobertura) y el anticuerpo de cabra anti *R. salmoninarum* conjugado (HRP) de peroxidasa de rábano, utilizando la titulación de la microplaca con el anticuerpo de cobertura y el conjugado HRP.
 - Aplicar el anti *R. salmoninarum* a los pozos de la microplaca a 1 µg por mL. La dilución se realiza desde una preparación de anticuerpo concentrado a 1 mg/mL y la dilución de trabajo del anticuerpo del conjugado HRP es de 1:2.000 (v/v).
- iii) Extracción y preparación de la muestra
 - Preparar los tejidos de peces o muestras de fluidos corporales para realizar el ELISA.
 - Calentar cada muestra a 100°C, por un período de 15 minutos. Luego, centrifugar a 8.000 a 10.000 x g por 10 minutos, a 4°C.
 - Derretir las muestras antes de calentarlas, en caso que hayan sido congeladas.
 - Almacenar las muestras, procesadas y calentadas a 4°C, o congelar a -70°C para pruebas posteriores.

2. Día 1 de ELISA:

Cubrir los pozos de la microplaca con inmunoglobulina (anticuerpo de cobertura).

- Utilizar una microplaca diseñada para ser utilizada en inmunoensayos, como ELISA. Estas microplacas se pueden adquirir desde diferentes proveedores, incluyendo Corning Glass Works, Costar, Dynatech Laboratories, Inc., y Nunc, Inc. El rendimiento de estas placas es variable y para un ELISA determinado, será necesario probar placas de diferentes proveedores para determinar cual es la más útil.
- Se recomienda separar un set de instrumentos de vidrio únicamente para preparar los reactivos de ELISA. Esto es muy importante para los laboratorios que realizan en forma continua cultivos de *R. salmoninarum*. Es posible que queden restos de proteínas extracelulares de bacteria, en especial del antígeno p57, en la superficie de los contenedores después de los lavados con detergentes convencionales y esterilización con vapor.
- Incluir varios controles en cada ELISA.
- Para determinar la cantidad de pozos de la microplaca a los cuales se le agregará el anticuerpo de cobertura, preparar mapas de la microplaca, los cuales deberán mostrar la ubicación de cada copia de un control o muestra de prueba específica. Luego, enumerar las microplacas.
- Calcular la cantidad de tampón de cobertura o anticuerpo de cobertura necesaria para cubrir cada microplaca en un ELISA particular. Preparar un volumen adicional de anticuerpo de cobertura para así compensar la solución que se pierde durante la preparación y pipeteo.

Ejemplo: Cálculo del volumen total de anticuerpo de cobertura a 1 µg/mL necesario para agregar 200 µL de anticuerpo a los pozos de 5 microplacas.

$$(5 \text{ placas}) (96 \text{ pozos/placa}) (200 \text{ µL/pozo}) = 96.000 \text{ µL} = 96 \text{ mL}$$

Preparar 105 mL de anticuerpo de cobertura a 1 µg/mL

$$X (1000 \text{ µg/mL}) = 105 \text{ mL} (1 \text{ µg/mL})$$

$$X = 0,105 \text{ mL} = 105 \text{ µL}$$

Mezclar 105 µL de IgG de anti – *R. salmoninarum* concentrado con 105 mL de tampón de cobertura.

- Diluir el anticuerpo de cabra concentrado para *R. salmoninarum* en un tampón de cobertura carbonato-bicarbonato, pH 9,6, o una solución comercial de cobertura. Cuando se utiliza una solución de cobertura, realizar preparaciones frescas para cada ELISA. Generalmente, desechar el tampón carbonato-bicarbonato luego de 30 días. Utilizar agua de grado reactivo o equivalente.
- No agregar anticuerpo de cobertura al conjugado de control (CC) ni a los pozos de control substrato-cromógeno (SC). Agregar 200 µL de tampón de cobertura en cada uno de estos pozos.
- Agregar 200 µL de anticuerpo de cobertura a los blancos (B) pozos de controles negativos (N), pozos de controles positivos (diluciones 1:100, 1:1.000, 1:2.000 y 1:5000) y los pozos diseñados para las muestras de la prueba.
- Sellar cada placa con un sellador adhesivo después de agregar el tampón o anticuerpo de cobertura. Colocar las placas en una cámara húmeda e incubar a 4°C por 16 horas.

3. Día 2 de ELISA

Lavar las microplacas para eliminar cualquier resto de inmunoglobulina.

- Preparar la solución de lavado PBS-T o diluir un concentrado comercial de solución de lavado en agua ultra pura. Almacenar toda la noche a 4°C. Agitar para asegurar la mezcla antes de agregar la solución de lavado.
- Durante el ELISA, es necesario que el tampón de lavado permanezca a temperatura ambiente.
- Este procedimiento se utiliza para todos los lavados siguientes.
 - ⇒ Lavar las placas en orden numérico.
 - ⇒ Eliminar cualquier resto de anticuerpo de cobertura, lavando 5 veces las placas, dejando decantar por 30 segundo cada vez que se vuelvan a cubrir los pozos. Eliminar cualquier exceso de tampón de lavado de cada placa, luego de terminar con los cinco lavados.
 - ⇒ Colocar las alícuotas de las muestras de prueba y control en los pozos de la microplaca.

- ⇒ Agregar 200 µL del diluyente de la muestra de prueba (solución salina de tampón de fosfato, pH 7,4 suplementada con Tween 20 al 0,05%) a los siguiente pozos de control:
 - ❖ Blanco (B)
 - ❖ Conjugado de control (CC)
 - ❖ Control de substrato-cromógeno (SC)
 - ❖ Agregar el tejido o fluido corporal a los pozos de tejido de control (N).
- ⇒ Sellar los pozos con sellador adhesivo y, luego, cargar los controles positivos.
- ⇒ Agregar 200 µL de alícuotas del control positivo a los pozos apropiados.
- ⇒ Sellar los pozos con otro sellador adhesivo antes de cargar las muestras de prueba.
- ⇒ Agregar 200 µL de alícuotas de cada muestra de prueba a los pozos adecuados.
- ⇒ Cubrir cada placa con un sellador adhesivo. Escribir sobre las placas la hora de término.
- ⇒ Incubar por 3 horas, en una cámara húmeda a 25°C.
- Lavar 5 veces las microplacas, tal como se explicó anteriormente.
- Agregar el conjugado HRP de cabra anti- *R. salmoninarum*.
 - ⇒ Primero, calcular la cantidad necesaria de anticuerpo de conjugado HRP (200 µL/pozo)

Ejemplo: Cálculo del volumen de una dilución de 1:2.000 del conjugado HRP necesario para las 5 microplacas.

$$(5 \text{ placas}) (96 \text{ pozos/placa}) (200 \text{ µL/pozo}) = 96.000 \text{ µL} = 96 \text{ mL.}$$

Nuevamente, realizar ~10 mL extra o 105 mL.

$$1/2000 = X/105 \text{ mL}$$

$$X = 0,0525 \text{ mL} = 52,5 \text{ µL}$$

Mezclar 52,5 µL del conjugado de stock HRP anti *R. salmoninarum* con 105 mL de diluyente.

- ⇒ Preparar el anticuerpo conjugado de HRP: leche en polvo descremada al 2% (p/v) en PBS, pH 7,4 o un concentrado comercial de solución bloqueadora/diluyente de leche.
- ⇒ Agregar 200 µL del conjugado disuelto a los pozos adecuados.

- ⇒ Agregar una cantidad equivalente de diluyente sin anticuerpo conjugado a los pozos de control sustrato-cromógeno (SC).
- ⇒ Sellar cada placa con un sellador adhesivo de placas e incubar en una cámara húmeda a 25°C, por un período de 2 horas.
- Lavar 5 veces la microplaca, tal como se explicó anteriormente.

4. Reacción sustrato-cromógeno

- El tiempo es muy importante en la reacción sustrato-cromógeno. Detener la reacción a los 20 minutos exactos.
- El volumen de la solución de detención “stop solution” (SDS) debe ser igual a 50 µL, lo que permite asegurar el perfecto relleno de los pozos.
- Preparar la SDS desde un concentrado al 5% (v/v), de la siguiente forma:
 - 4 partes de concentrado + 1 parte de agua
- Para comenzar la reacción sustrato (peróxido de hidrógeno) – cromógeno (ABTS):
 - ⇒ Colocar la cantidad necesaria de cámaras húmedas (sin las placas) en un incubador a 37°C y dejar que se equilibren antes de comenzar la reacción sustrato-cromógeno.
 - ⇒ Almacenar las placas limpias en otra cámara húmeda a temperatura ambiente o dejarlas en un mesón con cubierta de plástico, si es que no existe la cantidad suficiente de cámaras húmedas.
 - ⇒ Colocar el timer a 20 minutos para cada placa (no comenzar el proceso aún).
 - ⇒ Preparar la solución de sustrato-cromógeno.
 - ⇒ Agregar 200 µL de solución sustrato-cromógeno a cada pozo. Apenas se comience a agregar la solución, hacer funcionar el timer. Llenar todas las placas siguiendo un orden numérico.
 - ⇒ Una vez que todos los pozos tengan sustrato-cromógeno, sellar inmediatamente la placa y colocarla en una cámara húmeda a 37°C.
- Para detener la reacción sustrato-cromógeno y medir la absorbancia:
 - ⇒ Mientras se desarrolle la reacción sustrato-cromógeno a 37°C, preparar la solución de detención. Agregar 50 µL a cada pozo.

- ⇒ Una vez completado el período de incubación, agregar inmediatamente la solución de detención “stop solution”. Cada pozo debe recibir la solución en la secuencia exacta que se utiliza para agregar la solución sustrato-cromógeno.
- ⇒ Eliminar cualquier resto de condensación que se encuentre en el fondo de la placa y medir, inmediatamente, la absorbencia a 405 nm.

➤ **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** ⁶

En el caso del *Renibacterium* la región amplificada de ADN pertenece a la codificación del gen para la proteína p57. El sistema más utilizado produce la amplificación de un fragmento de 501 pares de bases, limitada por los sitios de unión de los dos primers, cuyas secuencias son:

5'-CAAGGTGAAGGGAATTCTTCCACT-3'

5'-GACGGCAATGTCCGTTCCCGGTTT-3'.

Para la extracción del ADN:

- i) Extraer el ADN de muestras clínicas utilizando el método fenol-cloroformo.
- ii) Luego de la homogeneización, mezclar 100 µL del tejido sospechoso en 1 mL de tampón Tris EDTA de sodio (ácido tetra acético diamino etileno) (100 mM NaCl, 100 mM EDTA y 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) y disolver utilizando 10 µL de dodecil sulfato de sodio al 20% (SDS).
- iii) Realizar los ciclos de extracción utilizando fenol cloroformo o cloroformo y agregar 10 µg de 10 mg/mL de ARNse para así permitir la digestión del ARN. Este procedimiento se lleva a cabo durante una hora, a una temperatura de 37°C.
- iv) Luego del segundo ciclo de extracciones, precipitar el ADN utilizando etanol absoluto frío; enjuagar en etanol al 70%, secar y volver a disolver en un tampón de 75 µL de Tris/EDTA (50 mM Tris/HCl y 10 mM EDTA, pH 8).
- v) Hace muy poco se descubrió que los tejidos de los riñones podían producir algún efecto inhibitorio y, además, reducir la sensibilidad de la prueba. Para minimizar estos efectos, se sugiere utilizar linfocitos ya disueltos y no tejidos frescos. Por otra parte, se describe un procedimiento de extracción simplificado.

⁶ Adaptación Manual OIE, 2000

- vi) Realizar la amplificación en 50 µL de una mezcla de reacción que contenga 10 mM de Tris/HCl, de pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl y una mezcla de 0,5 mM de nucleótido trifosfato (dNTP).
- vii) Luego, agregar primers de 50 pmol, 2,5 unidades de polimerasa de ADN Taq y cerca de 5-8 µg/mL de templados de ADN.
- viii) Pareciera que 30 ciclos de amplificación realizadas en un termociclador automático (94°C por 1 minuto, 48°C por un minuto y 72°C por 2 minutos) son suficientes.
- ix) Luego, analizar los productos obtenidos después de la migración por electroforesis en gel de agarosa y compararlos con los marcadores moleculares estándar para su identificación.

III.2.2. Piscirickettsiosis

La piscirickettsiosis es una condición septicémica de los salmónidos causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, que se presentó por primera vez en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). La enfermedad está presente en Chile desde 1989 y hasta ahora se ha presentado en Canadá, Irlanda y Noruega.

Se ha detectado *P. salmonis* en el salmón coho (*O. kisutch*), salmón chinook (*O. tshawytscha*), salmón sakura (*O. masou*), trucha arcoiris (*O. mykiss*), salmón pink (*O. gorbuscha*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*). La especie más susceptible es el salmón coho.

Para realizar un diagnóstico confirmatorio o positivo del *P. salmonis* existen las técnicas inmunológicas y las moleculares. En las primeras se destacan dos tipos de procedimientos:

- a) Detección directa del agente a partir de tejido infectado
- b) Detección del agente a partir de crecimientos en líneas celulares.

En ambos casos se utilizan las técnicas IFAT y ELISA para la identificación del agente.

La técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), recientemente implementada para *P. salmonis*, se realiza a partir de tejido de peces infectados o no sospechosos, o desde crecimientos de cultivos celulares del patógeno.

III.2.2.a) Identificación de *P. salmonis* en frotis de tejido teñido con Acridina-Orange

El método de la Acridina Orange fue recomendado por Lannan y Fryer (1991) para la detección de *P. salmonis* y forma parte de los procedimientos de identificación presunta del patógeno. La ventaja de esta técnica sobre los otros procedimientos de detección mediante tinciones, es que proporciona gran contraste entre la *Piscirickettsia salmonis* y el material de fondo y, además, comparada con la técnica de Tinción Giemsa, resulta más fácil observar los organismos, cuando estos se encuentran en bajo número.

Cabe hacer notar que las tinciones directas de tejidos, en frotis, tienen una baja sensibilidad y que, por lo general, se requiere que las bacterias estén en concentraciones elevadas para que puedan ser detectadas por medio de estas técnicas. Con Tinción Gram, se requiere que la bacteria esté en concentraciones de 10^8 bacterias/gr. de tejido para ser detectada (Fryer com.pers., 1992).

No existe información para cuantificar el número de bacterias que se requeriría por gramo de tejido para ser detectada por la Técnica Acridina Orange, no obstante, en base a criterios de calidad de los resultados, se deduce que es más sensible que Giemsa.

Para la **preparación de la Tinción Acridina-Orange**, se sugiere utilizar la siguiente formulación de tinción . (Lannan & Fryer, 1991):

- i) Agregar 20 gm de polvo de AO a 190 mL del tampón de acetato de sodio (100 mL 1 M $\text{CH}_3\text{COONa} - 3 \text{H}_2\text{O}$ y 90 mL 1 N HCl).
- ii) Ajustar el pH a 3,5 con 1 N HCl.
- iii) Almacenar en una botella café, a temperatura ambiente.

Para la **preparación y análisis de los portaobjetos** :

- i) Preparar frotis de impresiones de riñón, hígado y bazo, dejar secar y fijar por 5 minutos en metanol absoluto.
- ii) Irrigar los cubreobjetos con tinción AO por 2 min., lavar con agua potable y dejar secar.
- iii) Analizar los cubreobjetos usando aceite de inmersión con un microscopio de fluorescencia, equipado con los filtros bloqueadores apropiados.
- iv) En las preparaciones de tinción OA, las rickettsias pueden aparecer rojo-anaranjado brillante o de color verde. Los organismos individuales tienen entre 0,5-1,5 μm de

diámetro, son pleomórficos, predominantemente cocoidales. Generalmente, también se observan como anillos y pares de bastones curvados.

III.2.2.b) Tinción Giemsa

La tinción Giemsa de frotis de fluidos desde las células infectadas o de frotis de tejido de órganos infectados, muestran organismos pleomórficos teñidos de azul oscuro, de forma cocoidal o anillos, frecuentemente en pares, con un diámetro aproximado de 0,5-1,5 μm

III.2.2.c) Aislamiento de *P. salmonis* en cultivo celular

La preparación del tejido para el aislamiento de la bacteria en cultivo celular, consiste en:

- i) Extraer el riñón en forma aséptica y traspasarlo a un contenedor estéril. No utilizar antibióticos en ninguna etapa del proceso de aislamiento. Mantener el tejido a 4°C o sobre hielo hasta que sea procesado. No congelar.
- ii) Homogeneizar el tejido renal a 1/20 en solución salina tamponada PBS libre de antibiótico y luego, sin centrifugación, realizar diluciones 1/5 y 1/50 en PBS libre de antibiótico, para inocular sobre cultivo celular. Las diluciones finales para uso son de 10^2 y 10^3 .

Para la inoculación de la monocapa celular:

- i) Inocular una dilución de 10^2 y 10^3 de los órganos homogeneizados en cultivo celular. Mantener los cultivos en medios libre de antibióticos.
- ii) Inocular directamente el homogenizado diluido (0,1 mL/cultivo) en el medio de cultivo libre de antibiótico sobre las células.
- iii) Incubar el cultivo celular a 15-18°C por 28 días; analizar para detectar la aparición de ECP. El ECP rickettsial consiste en células redondeadas o racimos similares a placas. Con el tiempo, el ECP progresa hasta que todas las células son destruidas.
- iv) Si el ECP no ocurre (excepto en los controles positivos), incubar los cultivos a 15-18°C por 14 días adicionales.

III.2.2.d) Identificación de *P. salmonis* aisladas en cultivo celular

Utilizar las técnicas IFAT, ELISA y Moleculares.

➤ **IFAT**

- i) Hacer un frotis en portaobjetos con una suspensión extraída de los cultivos celulares que muestran ECP y analizar utilizando el método del anticuerpo fluorescente (FAT).
- ii) Los frotis de tejidos a ser examinados a través del FAT, deben corresponder a preparados frescos o almacenados a -20°C. Los resultados preliminares indican que la temperatura de almacenaje a -4°C no es recomendable.
- iii) Aplicar el anticuerpo primario a los frotis preparados.
- iv) Incubar los portaobjetos por 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad, en una cámara húmeda (pH 7,2).
- v) Lavar 10 veces con PBS y secar antes de aplicar el segundo anticuerpo.
- vi) Aplicar el conjugado FITC previamente diluido en PBS (siguiendo las instrucciones del proveedor).
- vii) Incubar los portaobjetos por 30 minutos.
- viii) Lavar 10 veces con PBS (pH 7,2) y dejar secar.
- ix) Contrateñir por dos minutos con verde metilo al 1%, para así reducir la fluorescencia no específica del fondo. Lavar y secar.
- x) Preparar el medio de montaje utilizando glicerol tamponado, pH 8,0.
- xi) Detectar la presencia de fluorescencia positiva (color verde) utilizando un microscopio de fluorescencia.

➤ **PCR**

Se ha desarrollado un PCR para detectar el ADN genómico de *P. salmonis*, usando primers bacteriales generales 16S rADN en la primera amplificación y primers específicos en la segunda reacción. Los dos primers específicos para *P. salmonis* - PS2A2 (223F) y PS2A2 (690R)- tienen las siguientes secuencias: 5'-CTAGGAGATGAGCCCGCGTTG-3' y

5'-GCTACACCTGCGAAACCACTT-3', respectivamente.

Para la preparación de los tejidos infectados

- i) Digerir 0,1 g de tejidos de riñón y bazo, por un período de 3 horas y a una temperatura de 65°C, en 250 mL de tampón de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 7,8, 2,5 mM MgCl₂, gelatina al 0,1%, NP40 al 0,45% y Tween 20 al 0,45% con 1 mg/mL de proteinasa K, la cual se debe agregar justo antes de comenzar).

- ii) Hervir los tejidos por 10 minutos, enfriar con hielo y centrifugar para eliminar los restos de células.
- iii) Utilizar volúmenes de 5 mL de sobrenadante como un templado de la amplificación PCR.

1. Reacción en cadena de polimerasa anidada (Nested)

- i) Agregar 5 mL de lisado de ADN de *P. salmonis* a 45 mL de la mezcla de reacción, consistente en tampón de PCR (10 mM Tris/HCl, pH 9, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl y Triton X-100 al 0,1%), 200 mM de dATP, dCTP, dTTP y dGTP a cada uno, 1 mM de *primer* EubA 1 mM *primer* EubB y 2,5 unidades de Taq polimerasa de ADN.
- ii) Cubrir la mezcla con 50 mL de aceite mineral.
- iii) Desnaturalizar la mezcla a 94°C, por un período de 2 minutos y, luego, amplificar a través de 35 ciclos a 94°C, por un período de 1 minuto, 50°C por 2 minutos y 72°C por 3 minutos.
- iv) Realizar la segunda amplificación, agregando 3 mL de los productos del primer PCR a la mezcla de reacción, la cual debe contener 2 mM de primers PS2S y PS2AS, y no los primers EubA y EubB, siguiendo las siguientes condiciones de reacción: 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 61 °C por 2 minutos y 72°C por 3 minutos.
- v) Analizar el ADN amplificado (476 bp) (10 mL de la mezcla de reacción PCR) a través de electroforesis en un gel TAE de agarosa al 2% (40 mM acetato Tris/1 mM EDTA [ácido tetra acético diamine etileno], el cual debe contener 1 mg por cada 50 mL de bromuro de etidio.
- vi) Para confirmar la identificación, digerir 10mL de alícuotas de la mezcla de amplificación PCR con *EcoRI* y *PstI* siguiendo las instrucciones del proveedor (productos esperados: *EcoRI* 994, 546; *PstI* 541, 519, 480).

2. Reacción en cadena de polimerasa directa

- i) Agregar 5 mL de lisado de ADN de *P. salmonis* a 45 mL de una mezcla de reacción que contenga tampón de PCR (10 mM Tris/HCl, pH 9, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl y Triton X-100 al 0,1%), 200 mM de dATP, dCTP, dTTP y dGTP a cada uno, 2 mM de *primer* PS2S y PS2AS a cada uno y 2,5 unidades de Taq polimerasa de ADN.
- ii) Cubrir la mezcla con 50 mL de aceite mineral. Cuando se agrega un paso de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, realizar el PCR directo bajo la mismas condiciones de reacción que se utilizaron para el segundo paso del PCR anidado (nested).

III.2.3. Yersiniosis o Enfermedad Entérica de la Boca Roja (ERM)

La enfermedad de la boca roja (ERM), causada por *Yersinia ruckeri*, aparece más frecuentemente en aguas cálidas de alto contenido orgánico después de algún estrés o daño resultado de manejo, parásitos externos, bajo contenido de oxígeno o malas condiciones en general. Es normalmente una septicemia generalizada con signos clínicos virtualmente indistinguibles de otras septicemias; pero la presencia frecuente de enrojecimiento en la boca, hemorragias en el bajo intestino y una descarga amarilla del ano puede orientar el diagnóstico.

La enfermedad puede ser peraguda (mortalidades sin lesiones gruesas) y aguda (hemorragia de branquias y órganos internos, fluidos sanguinolentos en la cavidad del cuerpo) a subaguda y crónica.

III.2.3.a) Identificación presunta

- i) Utilizar un bacilo, gram-negativo, citocromo oxidasa-negativo y que no produzca indol.
- ii) Analizar las placas de agar MacConkey con un día de incubación.
- iii) Desechar las colonias rojas o mucoides.
- iv) Seleccionar las colonias pequeñas (1-2 mm diámetro), planas, incoloras o color rosa pálido.
- v) Realizar las pruebas bioquímicas adecuadas.

➤ **Prueba agar *Fenilalanina deaminas***

Agregar 2-3 gotas de solución de cloruro férrico al 10% en agar inclinado. Si se observa un color verde significa que el resultado es positivo..

➤ **Test del indol**

Agregar 0,2-0,3 mL de reactivo de Kovac. Si se observa un color rojo profundo en la superficie del crecimiento significa que la prueba es positiva.

➤ **Test V-P**

Agregar 0,6 mL de alfa-naftol y agitar bien. Agregar 0,2 mL de solución de NaOH al 40% con creatina y agitar. Leer los resultados después de 4 horas. Si se observa un color rojo rubí o rosado en el medio, significa que el resultado es positivo.

➤ **Test de la *Pirazinamidas***

Después del crecimiento del cultivo en agar de *pirazinamidas* inclinado a temperatura ambiente, agregar 1 mL de sulfato de amonio ferroso al 0,1% recién preparado, sobre el agar inclinado. El desarrollo de color rosado dentro de 15 minutos es positivo, indicando presencia de ácido pirazinoico formado por la enzima pirazinamidas.

➤ **Test Beta-D- glucosidasa**

Agregar 0,1 g de 4 *nitrofenil-beta-glucopiranosido* a 100 mL de 0,666 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4(\text{pH}_6)$. Disolver y esterilizar por filtración.

➤ **Reacción en Cadena de Polimerasa PCR para *Yersinia ruckeri*** (según Gibello et al 1999) desde molécula de ARN (secuencia 16S)

III.2.3.b) Diagnóstico Confirmatorio

La mejor forma de realizar la prueba es usar el Test de Aglutinación en portaobjetos, o la técnica del anticuerpo fluorescente indirecta. Esta última técnica se puede aplicar directamente sobre el tejido, de este modo facilita un diagnóstico anticipado de ERM .

Extracción de ADN cromosomal

- i) Extraer las bacterias de colonias puras desde placas de agar y suspender en agua destilada estéril. Centrifugar a 2000 x g. – 4000 x g.
- ii) Resuspender el sedimento en 500 µL de tampón TES [N-Tris (hidroximetil) metil-2-ácido aminoetano sulfónico] que contenga 50 µg de lisosina (Sigma) e incubar a 37°C por 30 minutos.
- iii) Agregar 5 µL de solución de proteinasa K 10 mg/mL.
- iv) Incubar la mezcla a baño María, a 65 °C por dos horas.
- v) Agregar 50 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) y colocar nuevamente al baño María, a 65°C por 10 minutos más.
- vi) Tratar 2 veces la solución con fenolcloroformo 1:1 y recuperar la fracción acuosa..
- vii) Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol puro; centrifugar a 2000 x g y secar.
- viii) Disolver en 50 µL de agua destilada estéril que contenga 2 U de ARNs.
- ix) Almacenar a -20 °C.

➤ Amplificación ADN

Una vez extraída la muestra de tejido o colonia bacteriana, proceder de la siguiente forma:

- i) Utilizar 100 µL de la muestra que contiene el ADN genómico (aproximadamente 70 ng de ADN bacterial) o 20 µL de ADN extraído de tejido de peces.
- ii) Utilizar 1 mM de cada primer, 2 mM de cada trifosfato de oxinucleótido, 10 µL de tampón de polimerasa Taq (Biotools) y 1 U de polimerasa Taq (Biotools).
- iii) Realizar la reacción de amplificación en un termociclador de PT-100 utilizando 25 ciclos de desnaturalización por un período de 1 minuto a 92 °C, acoplamiento a la temperatura seleccionada (57 o 60^a C) por 1 minuto, otro minuto a 72 °C y seguido por una extensión final de 72 °C por 5 minutos.
- iv) Incluir controles negativos (ADN no modelado) y positivos (50 ng de ADN purificado extraído de *Y. ruckeri* CECT 956) para cada lote de mezclas de PCR.
- v) Detectar los productos generados de PCR, utilizando gel de agarosa al 1% sometiendo a electroforesis 10 µl de la mezcla de amplificación.

Primers para amplificación PCR de *Yersinia*

Yer 8	(5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3')
Yer 11	(5'-CACTTAACCCTTCCTCCTCGC-3')
Yer 10	(5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3')
Yer 12	(5'-AGTAATGTCTGGGGATCTGCC-3')

III.2.4. Furunculosis

Esta enfermedad se ha presentado en América del Norte, Sudamérica, Europa, Asia y África, y es causada por *Aeromonas salmonicida*.

A pesar que generalmente se le asocia con peces de agua dulce, se cree que los peces de agua de mar también son susceptibles.

El diagnóstico se basa en el análisis de los signos clínicos característicos de la enfermedad y el aislamiento de los organismos causantes. El aislamiento primario se lleva a cabo de mejor forma con siembra del riñón, ya sea en TSA o BHIA, a una temperatura de 20-25°C por 24-48 horas. Existen algunos indicios que existen ciertas cepas de la *Aeromonas salmonicida* que no crecen en TSA.

III.2.4.a) Diagnóstico Presunto

Las características que presenta el organismo cultivado en TSA o BHIA son:

- Tamaño pequeño (1,2 x 0,8 μ m).
- No motil.
- Bastones con gram negativo que representa una oxidasa positiva.
- Glucosa positiva.
- Gelatinasa positiva.

La mayoría de las cepas producen una pigmentación café difusa. Además, se describe un aislamiento negativo de oxidasa.

Se han utilizado diferentes técnicas inmunológicas para lograr un diagnóstico rápido de la furunculosis directamente desde los tejidos de los peces clínicamente enfermos. Entre estas técnicas se encuentran: aglutinación de glóbulos de látex; coaglutinación de estafilococos; prueba de ligación inmunoenzimática (ELISA, Austin et al. 1986).

III.2.4.b) Diagnóstico Confirmatorio

Es posible identificar las *Aeromonas salmonicida* aisladas en un cultivo, utilizando procedimientos serológicos, como por ejemplo FAT o pruebas de aglutinación (microtítulo o portaobjeto). Se debe poner especial cuidado cuando se utilice las pruebas de aglutinación, ya que muchas de las cepas de *Aeromonas salmonicida* se autoaglutinan en la solución salina. Se han utilizado pruebas modificadas de aglutinación, por ejemplo, aglutinación de glóbulos de látex o coaglutinación estafilococo como una manera de evitar el problema de la autoaglutinación. Por otra parte, es posible identificar los organismos a través de una identificación fenotípica extensa.

Para las pruebas IFAT se procede según los protocolos entregados.

➤ Hemoaglutinación

- i) Suspender el inóculo de la colonia bacteriana en 0,5 mL de solución salina ajustada a pH 11 con NaOH en tubos de ensayo pequeños.
- ii) Calentar en agua hirviendo por 15 minutos.
- iii) Clarificar por centrifugación y reservar el sobrenadante.
- iv) Transferir el sobrenadante a un tubo conteniendo 0,04 mL de glóbulos rojos de oveja formalizados (GR-O), suspender las células e incubar en agua a 37°C por 15 minutos.
- v) Sedimentar y lavar los GR-O con solución salina y suspender en 0,25 mL de solución salina.
- vi) Mezclar una gota de suspensión de hemocitos (GR-O) con una gota de suero anti-*A. salmonicida* en un portaobjeto limpio; observar la aglutinación.
- vii) Preparar una mezcla para control positivo usando GR-O sensibilizado con el antígeno homólogo preparado previamente.
- viii) Preparar controles negativos de la siguiente manera:
 - ❖ Una gota de antisuero y una gota de suspensión de hemocitos (GR-O) no sensibilizados.
 - ❖ Una gota de solución salina y una gota de hemocitos sensibilizados.
- ix) Una evidencia rápida macroscópica de formación de grumos (aglutinación) en la muestra en cuestión y en el control positivo (pero no en los controles negativos) constituye la confirmación.

III.2.5. Flavobacteriosis

Flavobacterium psychrophilum es el agente causante de la “enfermedad del agua fría” (cold-water disease) y del síndrome del alevín de la trucha arcoiris (RTFS), dos enfermedades comunes de salmónidos, principalmente trucha arcoiris y salmón coho. Estas enfermedades causan grandes pérdidas en la mayoría de las áreas con cultivo intensivo de salmónidos, tales como Estados Unidos, Canadá, Chile, Europa, Japón y Tasmania. Esta bacteria ha sido aislada ocasionalmente en no salmónidos como anguila (*Anguilla anguilla*) y otros. (Urdaci et al, 1998)

La presencia y persistencia de *F. psychrophilum* en ambientes acuáticos naturales no ha sido registrada, una razón para eso puede ser la carencia de métodos apropiados para detección. El aislamiento de esta bacteria usando cultivo en placas de agar es en muchos casos inadecuado debido al lento crecimiento de las células (Wiklund et al, 2000).

El diagnóstico está basado en los signos clínicos seguido por el aislamiento e identificación del agente. El aislamiento primario debe ser hecho de lesiones o del bazo en agar citófaga. En Chile se usa el medio MAOA modificado (Anexo I). Los cultivos son incubados a temperatura de 15 –20 °C por 3-5 días.

III.2.5.a) Diagnóstico presunto

Está dado por la presencia de bacilos largos, Gram negativo, en lesiones de piel y músculo observados a partir de frotis teñidos, utilizando la técnica Gram y la observación en microscopio óptico y el crecimiento de colonias amarillas convexas en agar citofaga. La identificación de bacterias, según las características bioquímicas, se presenta en las Tablas VI, VII, VIII y IX.

III.2.5.b) Diagnóstico confirmatorio

El diagnóstico es confirmado a través de identificación serológica positiva por medio de la aglutinación en portaobjetos o la técnica de FAT indirecto. Los pasos para realizar estas técnicas se describen al comienzo de este capítulo. Recientemente se está incorporando la técnica de PCR para la identificación de este agente.

Se describe la técnica PCR a partir de los trabajos de Urdaci et al, 1998 y Wiklund et al, 2000.

Primers oligonucleótidos para *F. psychrophilum*

Primer directo FP1	5'-GTTAGTTGGCATCAACAC-3'	186 a la 203 bp
Primer inverso FP2	5'-TCGATCCTACTTGCGTAG-3'	1278 a la 1261 bp

Condiciones de la amplificación

- i) Preparar una mezcla de 25 μ L que contenga 25-50 mg de ADN genómico de la bacteria o 1 a 10 μ L de ADN extraído de tejido del pez, 10 pM de cada primer, 50 μ M de cada dNTP y 1 U de Taq ADN polimerasa, en 2,5 μ l de tampón PCR 10x. Agregar una gota de aceite mineral.
- ii) Realizar la reacción de amplificación de la siguiente manera:
Desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, acoplamiento a 54°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 10 minutos.
- iii) El producto de la PCR será detectado sometiendo la mezcla de la reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) con bromuro de etidio, por un período de 1 hora, a 10 V/cm en tampón tris borato (89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). Visualizar en transiluminador.

Tabla VI. Caracteres Bioquímicos distintivos de Citofagáceos y Flavobacteriáceos .

CARACTERES	E S P E C I E S		
	<i>Flexibacter columnaris</i>	<i>Flavobacterium psychrophilus</i>	<i>Flavobacterium branchiophila</i>
Cultivo a 25° C	+	-	+
Cultivo en NaCl al 0.4%	Variable	+	-
Pigmento amarillo	+	+	+
Oxidasa	+	-	+
Glucosa	Variable	-	+
H₂S	+	-	-
Celulosa	-	+	-
Almidón	-	-	+
Gram	-	-	
OF	0	0	
Nitrato	+	-	
Fluorescencia	-	-	
Motilidad	-	-	
Gelatina	+	+	
Esculina	-	-	
Indol	-	-	
H₂S	-	-	
Catalasa	+	+	
Voges-Proseleasa	-	-	

Tabla VII. Caracteres Bioquímicos 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	+ (ex)	+ (ex)	+	+
A 37°C	+ (ex)	+ (ex)	variable	-
Gas en Glucosa				
A 22°C	+ (ex)	+	-	-
A 37°C	+ (ex)	+	variable	-
ONPG	+	-	variable	+
LDC	-	+	+	+
ODC	Variable	+	+	+
Citrato de Simmons	+ (ex)	-	+	Variable
H₂S	+ (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	+	-	+	-

Tabla VIII. Caracteres distintivos de *Aeromonas* frecuentes en peces.

CARACTER	ESPECIES					
	<i>A. hydrophyla</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. salmonicida salmonicida</i>	<i>A. salmonicida masoucida</i>	<i>A. salmonicida atípica</i>
Crecimiento a 37°C	+	+	+	-	-	-
Pigmento marrón soluble	-	-	-	+	variable	-
Motilidad	+	+	+	-	-	-
Nitrato reductasa	+	+	+	+	+	Variable
Gas en glucosa	+	-	Variable	+	+	- (ex)
ONPG	+	+	+	+	+	Variable
ADH	+	+	+	+	+	Variable
LDC	- (ex)	- (ex)	- (ex)	-	+	Variable
Citrato de Simmons	Variable	Variable	Variable	-	-	-
H ₂ 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	+	+	-	-	-	

Tabla IX. Características de *Renibacterium salmoninarum*

CARACTERÍSTICA	RESPUESTA	CARACTERÍSTICA	RESPUESTA
➤ Producción de:		➤ Degradación de:	
Ácido phosphatasa	+	ARN	-
Alcalino phosphatasa	+	Starch	-
Butirato esteraso	-	Testoterona	-
Caprylato esteraso	+	Tributyryn	+
Catalasa	+	Tween 40	+
Chymothrypsinasa	-	Tween 60	+
Cystina arylamidasa	-	Tween 80	-
a-Fucosidasa	-	Tyrosina	-
a-Galactosidasa	-	Xantina	-
b-Galactosidasa	-	Ácido para produc.azúcar	-
b-Glucosamidasa	-	Growth on/at:	
a-Glucosidasa	+	PH 7,8	+
b-Glucosidasa	-	Bile salts, 0,025%,(w/v)	-
b-Glucoronidasa	-	Crystal violeta, 0.0001%(w/v)	+
Leucina arylamidasa	+	Azul metileno 0.001% (w/v)	-
a-Mannosidasa	+	Azul nilo 0.00001% (w/v)	+
Myristata esterasa	-	Fenol 0,025% (w/v)	-
Oxidasa	-	Potasio tiosanato 1% (w/v)	-
Tripsinaza	+	Cloruro de sodio 1% (w/v)	+ (poor)
Arylamidasa valina	-	Sodio selenita 0,01% (w/v)	-
Nitrato reduction	-	Acetato de thalious 0,001% (w/v)	-
➤ Degradación de:		➤ Uso de:	
Adenina	-	4-umbelliferyl (4MU)-acetato	+
Aesculin	-	4MU-butyrato	+
Arbutin	-	4MU-b-D-cellobiopyranoside monohydrate	-
Casein	+	4MU-claidate	-
Chitin	-	4MU-a-L-arabinopyranoside	-
Chondroitin	-	4MU-2-acetamido-2-deoxy-b-D-	-
ADN	-	4MU-b-L-fucopyranoside	-
Elastin	-	4PU-heptanoate	+
Gelatin	-	4PU-laurate	+
Guanine	-	4PU-nonanoate	+
Ácido hyaluronic	-	4MU-oleate	+
Hypoxanthine	-	4MU-palmitate	-
Lecithin	-	4MU-propionate	+

Fuente: Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases 2000

IV. ENFERMEDADES PARASITARIAS

IV.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

La primera parte de un programa de rutina de monitoreo o un proceso de diagnóstico puede ser un examen externo parasitológico. Un examen interno parasitológico debe preceder a un examen bacteriológico, el cual se debe practicar en condiciones asépticas. Cuando se requieran múltiples muestras ictiológicas para bacteriología, histología, virología o parasitología, los métodos de muestreo y el orden de los procesos dependerán de la cantidad de muestras de muestras disponibles. En el caso que la cantidad no sea restrictiva, el tamaño de la muestra aumentará de acuerdo a las necesidades y se utilizarán muestras bacteriológicas sacadas de peces seleccionados especialmente para este proceso. Las muestras de tejido para practicar pruebas virológicas, parasitológicas y/o histológicas se deben tomar de los peces restantes.

La recuperación e identificación adecuada de los parásitos de los peces depende del estado de frescura del huésped, por lo que se prefiere utilizar muestras de peces vivos. Si esto no es posible, el orden de preferencia para la presentación de las muestras es el siguiente:

- a) Recién muerto y conservado en hielo.
- b) Preservado con un fijador apropiado
- c) Congelado.

Analizar los sedimentos de cada contenedor para detectar la presencia de parásitos externos que se hayan soltado o parásitos internos regurgitados o eliminados vía anal.

La sobrevivencia de los parásitos, posterior a la muerte del huésped, dependerá de la temperatura en que se mantenga el pez. Mientras más baja es la temperatura en la que se mantiene el huésped, mayor es la tasa de sobrevivencia de los parásitos. Es posible que algunos parásitos muestren ciertos cambios morfológicos después de la muerte del huésped. Además, es probable que los parásitos internos emigren de sus lugares de infección y que los parásitos externos se desprendan del huésped muerto. Sea cual sea el proceso por el cual se tomen las muestras del pez huésped para ser enviada a un laboratorio de diagnóstico, se debe preparar el huésped inmediatamente después de su muerte.

En algunos casos es muy difícil analizar un pez preservado en su totalidad, debido a la rigidez y fijación de los músculos. Bajo ciertas condiciones, será necesario eliminar *in toto* las vísceras, cuando no sea práctico o no sea necesario analizar materiales frescos, realizando un corte en la unión faríngea/esofágica y el ano. Además, en este momento también se eliminan los riñones y la vejiga natatoria. Luego, se deberán fijar las vísceras y almacenarlas para su posterior análisis. Por otra parte, cuando las vísceras ya estén fijadas, se podrán transportar envolviéndolas en una toalla de papel empapada con formalina al 5-10% y colocándolas en una bolsa plástica sellada. Para evitar cualquier pérdida de contenido, amarrar los extremos del esófago y ano con un pedazo de hilo.

IV.1.1. Procedimientos generales de Necropsia

IV.1.1.a) Análisis de Sangre

En caso que se necesite realizar un examen de sangre para detectar parásitos, sacar la muestra de un pez recién muerto, antes que se produzcan coágulos y/o hemólisis.

Para sacar la muestra de sangre se podrán seguir cualquiera de los siguientes métodos y ubicación del huésped:

- a) Punción cardíaca con una jeringa o tubo de microhematocrito (Goede, 1989).
- b) Penetración de la aorta dorsal vía cavidad bucal o a través de la línea lateral.
- c) Desde la vena caudal por medio de una jeringa o separando el pedúnculo caudal.
- d) Cortando uno de los vasos de la branquia.

Realizar una heparinización del vaso de recolección, sin importar la ruta o método utilizado, para evitar la coagulación. Cuando se realiza inmediatamente la transferencia de sangre al vaso recolector, no es necesario heparinizar la jeringa de recolección.

Los parásitos vivientes móviles, como por ejemplo los nemátodos larvales y flagelados, se podrán examinar en una gota de sangre fresca diluída en suero fisiológico. Luego de realizar la centrifugación microhematocrítica, es muy fácil recuperar los parásitos flagelados de la capa intermedia o célula blanca de una muestra de sangre. Para facilitar el examen, mezclar la sangre fresca con una cantidad igual o mayor de solución salina.

Para exámenes posteriores será necesario preparar una solución de sangre, para lo que se necesitará sólo una gota de ésta. Este es un procedimiento muy fácil que se logra al tocar el tubo microhematocrito que contiene sangre con uno de los extremos del portaobjetos. Luego, colocar un segundo portaobjetos contra el borde de la gota para así crear una película gruesa de capa celular. Secar la solución a temperatura ambiente, fijar 10 minutos en metano y realizar una tinción con tinción Romanovsky (Humason, 1979).

IV.1.1.b) Exámenes Externos

Realizar un cuidadoso análisis de la superficie total del pez, incluyendo la cavidad bucal y opercular, orificios de la nariz, branquias y aletas. En el caso que no exista un período de fijación o se examine una gran cantidad de peces, realizar la detección de los parásitos externos a través de un examen de la mucosa de diferentes partes del cuerpo, incluyendo cabeza, aletas pectorales y caudales. Es posible analizar la superficie externa de un pez pequeño con la ayuda de un microscopio de disección. Por otra parte, para los exámenes a los peces más grandes será útil usar una lupa manual.

Para eliminar los protozoos y tremátodos monogénicos de la superficie externa y branquias, colocar el pez o tejidos individuales en una solución de formalina al 1:4000. Es mucho más fácil manipular los parásitos más pequeños utilizando una pipeta Pasteur. Luego, analizar los orificios de la nariz haciendo un lavado con solución salina haciendo uso de una pipeta Pasteur y hacer un montaje húmedo o realizar un frotis del fluido.

El mucus se puede extraer pasando por un costado del pez el portaobjetos o el cubreobjetos o utilizando el extremo no cortante de un bisturí y luego colocándolo en el portaobjetos. Cuando se trabaja con una preparación fresca, mezclar el mucus con solución salina y luego examinarla en un microscopio compuesto, utilizando un objetivo de 10X - 40X. Para reconocer los protozoos, se recomienda utilizar contraste de fase. Se debe tener mucho cuidado al colocar el cubreobjetos sobre el material en estudio al momento de preparar una solución fresca, ya que, al aplicar demasiada presión, se pueden producir artefactos. El agua destilada podrá ser sustituida por una solución salina en cualquiera de las preparaciones expuestas en estos procedimientos. Sin embargo, el uso de este tipo de solución puede ser decisivo en la mantención de las condiciones osmóticas óptimas de ciertos parásitos.

Para que no se produzcan burbujas de aire, colocar suficiente solución salina en el portaobjetos y, luego, ubicar en forma apropiada el cubreobjetos. Para eliminar el exceso de solución salina, tocar el borde del portaobjetos con una toalla de papel absorbente. En el caso que la solución salina no sea suficiente, agregar más por uno de los extremos del portaobjetos.

Si durante los exámenes se observan quistes de protozoos o helmintos enquistados, aplicar un poco de presión con el portaobjetos para liberar dichos organismos. Los gusanos enquistados deben ser liberados antes de practicar la fijación.

➤ **Opérculos y branquias**

Cortar los opérculos, colocarlos en una placa Petri y examinarlos con un microscopio de disección. Los arcos branquiales se deben extraer en forma separada, para luego colocarlos en una placa Petri con solución salina y examinarlos en un microscopio de disección. Para examinar más detalladamente filamentos branquiales, utilizar un microscopio compuesto. Si se está trabajando con un pez demasiado pequeño, colocar todo el arco branquial en un portaobjetos con solución salina y cubrir con un cubreobjetos. Si no es el caso, cortar una sección del arco branquial, colocarlo en un portaobjetos, cortar los filamentos utilizando un bisturí y eliminar el arco branquial. En caso que el pez sea demasiado grande, cortar parte de los filamentos branquiales con una tijera y colocarlos directamente en un portaobjetos con solución salina. Si se desea, se puede seccionar las preparaciones de las branquias que se encuentran en los portaobjetos, utilizando un bisturí y, así, facilitar la detección de los parásitos. Para facilitar la detección de protozoos, colocar una o dos gotas de tinción nuclear azul de metilo al 1% o verde metileno al 1%. Estas metodologías también son aplicables a las aletas y preparaciones de mucus.

➤ **Ojos**

Examinarlos cuando aún se encuentren en las órbitas. Extraer cada ojo utilizando pinzas o tijeras y, luego, colocarlos en una placa Petri con suficiente solución salina como para cubrir el ojo. Realizar un corte para abrir el ojo y examinar el cristalino, humor y retina. En caso que se extraiga el cristalino, preparar un montaje húmedo con los restos del contenido del ojo y examinar con un microscopio compuesto.

IV.1.1.c) Exámenes Internos

Si además de los exámenes parasitológicos se desea realizar exámenes bacteriológicos, desinfectar la superficie externa del pez antes de exponer la cavidad del cuerpo.

Colocar el pez sobre uno de sus costados y abrir desde la región de la boca a la anal, realizando una incisión ventral. Utilizar un par de tijeras de disección, colocando la punta roma hacia la cavidad del cuerpo, lo que permite disminuir el daño a los órganos internos. Es posible eliminar la musculatura interna, pero es una opción individual.

➤ Cavidad Abdominal

Primero, examinar la cavidad del cuerpo para detectar posibles parásitos enquistados. Luego, extraer el corazón y colocarlo en una placa Petri con solución salina. Extraer las vísceras *in toto* realizando un corte desde la unión faríngeoesofágica, incluyendo los intestinos gruesos, hasta el ano. Luego, colocar las vísceras en una placa Petri con solución salina. Si se necesita realizar exámenes más detallados, extraer hígado, vejiga natatoria, bazo, esófago, ciegos pilóricos /páncreas e intestino (subdividido si es necesario) y colocarlos en placas Petri individuales para su análisis. Se debe tener mucho cuidado de no desinflar la vejiga natatoria, ya que es mucho más fácil de analizar cuando está llena. En esta etapa es posible extraer y examinar riñones, uréteres y vejiga urinaria.

Es posible preparar soluciones de los contenidos del uréter, vejiga gaseosa y vejiga urinaria, vaciando estos órganos en un cubreobjetos o utilizando una aguja y jeringa de tuberculina, para así eliminar los contenidos de los dos últimos órganos. Además, también se podrán preparar improntas de estos órganos, al igual que de los riñones, hígado y gónadas.

Para eliminar los quistes, colocarlos en un portaobjeto de microscopio y, luego, separar las paredes enquistadas para liberar los contenidos. Si esto no es posible, colocar un cubreobjetos sobre el quiste y aplicar la presión suficiente para aplastar el quiste. Liberar los helmintos enquistados antes de realizar la fijación.

Extender los segmentos del canal alimenticio en una placa Petri y realizar un corte longitudinal para examinar el contenido. Realizar soluciones (húmedas o fijas) del epitelio y contenidos intestinales para analizar la posible presencia de parásitos. Inundar el tracto digestivo de un pez grande con solución salina y examinar los contenidos gástricos separados de la pared del tracto.

Es posible examinar una cantidad representativa de ciegos pilóricos extrayendo sus contenidos. Este no es procedimiento difícil y se lleva a cabo extrayendo los ciegos de su extremo intestinal utilizando pinzas. Utilizar otro par de pinzas para deslizar cada ciego individual con la punta roma hasta el extremo abierto y aplastar su contenido. En general, no es muy práctico abrir grandes cantidades de ciegos, a menos que sea necesario realizar un análisis cuantitativo.

➤ **Cerebro**

Generalmente, el último órgano que se extrae es el cerebro de un pez, debido a que no es fácil de acceder. No es necesario que el cerebro esté absolutamente intacto al momento de practicar un examen parasitológico. En peces menores a 15 cm, será necesario cortar el neurocráneo en forma longitudinal utilizando unas tijeras de disección. Colocar la punta roma en la boca y la punta aguda en línea directa con los ojos. En general, será necesario realizar un solo corte, con el cual quedará al descubierto el cerebro. Extraer utilizando fórceps, aplastar y, luego, examinar. Para los peces de mayor tamaño será necesario utilizar una tijera corta huesos.

➤ **Musculatura**

Generalmente, la musculatura es lo último que se somete a análisis, para lo cual se sigue el siguiente procedimiento:

- a) Cortar la musculatura epaxial en intervalos regulares.
- b) Extraer los dos filetes, cortarlos y/o iluminarlos.

La iluminación consiste en transmitir una luz a través del filete del pez, lo que permite iluminar y detectar las etapas parasitológicas presentes en la musculatura. La eficacia de este método dependerá del grosor del filete. Además, es posible que sea necesario aplastar el filete para detectar posibles quistes. La digestión en polvo de pepsina del 0,5% en agua y HCl a 37°C puede facilitar los análisis cuantitativos.

IV.1.1.d) Fijación y Tratamiento de los Parásitos

Existe una amplia gama de fijadores útiles para la preservación y almacenamiento de los parásitos de los peces, entre los que se encuentran Formol-alcohol (por ej. AFA), Bouin's y formalina (Humanson, 1979). El fijador más común es la formalina, aunque existe confusión con relación a su uso.

En la Tabla X se presenta un resumen de los métodos recomendados, clasificados por grupo, para la preservación de los parásitos.

➤ Soluciones acuosas de Protozoos/Helmintos pequeños

Existen dos formas para crear una preparación temporal de solución de protozoos o helmintos pequeños. Para almacenar una preparación durante toda una noche:

- i) Colocar una toalla de papel húmeda en el fondo de una placa Petri;
- ii) Colocar encima el portaobjeto con el espécimen; colocar la tapa y almacenar en un refrigerador a 4°C.

En el caso que se quiera mantener una solución por varios días:

Agregar un anillo de quita esmalte o jalea de petróleo alrededor del perímetro de la tapa, lo que permitirá evitar la deshidratación y almacenamiento en un refrigerador.

Cuando sea necesario fijar cualquier solución temporal, agregar un fijador en uno de los extremos del tapón, lo que permitirá que el papel absorba la solución salina y, así, crear una acción capilar bajo el tapón, lo que dirigirá el fijador hacia la muestra.

➤ Helmintos, Acantocéfalos y Sanguijuelas

- i) Fijar bajo presión de luz de un tapón o portaobjeto de vidrio a los tremátodos, céstodos y sanguijuelas vivientes, cuando sea necesario.
- ii) Reemplazar lentamente la solución salina por un fijador tibio.
- iii) Antes de la fijación, limpiar todos los parásitos helmintos, lo que se logra colocando el parásito en un frasco de tamaño apropiado lleno de solución salina, tapándolo y agitándolo vigorosamente.
- iv) La mejor forma de manipular los parásitos pequeños es succionarlos con una pipeta Pasteur, lo que permitirá disminuir los daños; por otra parte, la mejor forma para manipular los parásitos de mayor tamaño es utilizando pinzas.

- v) Luego, decantar el fluido y repetir el procedimiento si es necesario.
- vi) Fijar los tremátodos, céstodos, acantocéfalos y sanguijuelas en formalina tamponada en forma neutral al 5-10% por un período de 24 horas y, luego, transferirlos a etanol al 70% para su almacenamiento y/o transporte.
- vii) Antes de la fijación, se puede relajar muchos de los parásitos helmintos en agua fresca. Algunos parasitólogos aconsejan relajar los céstodos en agua a 80°C y, luego, reemplazar el agua por un fijador. Si se utiliza agua o fijador demasiado caliente, se pueden producir burbujas en el tegumento o cutícula de ciertos parásitos, por lo que se recomienda utilizar formalina tibia (50°C) para relajar y fijar los parásitos vivos.
- viii) Dejar el acantocéfalo en agua destilada y refrigerar toda la noche para inducir la eyección de la probosis antes de fijar en formalina tibia.
- ix) Quizás sea necesario hacer orificios en los nemátodos y acantocéfalos de mayor tamaño utilizando agujas finas de disección. Para este propósito lo mejor es colocar alfileres entomológicos en el extremo de las clavijas pequeñas de madera, así como también para manipular pequeños parásitos delicados.
- x) Para fijar los nemátodos y crustáceos vivos, utilizar una solución tibia de glicerina al 5-10% en etanol al 70%, por un periodo de 24 horas y, luego, transferirlos a una solución fresca para su posterior almacenamiento. Además, también se pueden fijar en formalina al 10% y luego traspasarlo a glicerina/etanol para su posterior almacenamiento.
- xi) Asegurar la adecuada rotulación de todos los contenedores, sin importar su contenido. Las etiquetas se deben escribir con lápiz grafito y colocar al interior del contenedor. Se deberá colocar una segunda etiqueta en la parte exterior del contenedor, no obstante, la etiqueta interior es de mayor importancia.

Tabla X: Métodos recomendados para la preservación de Parásitos destinados a la Identificación.

Grupo De Parásitos	Procedimiento de Relajación	Fijación	Almacenamiento	Preparación Final para la Identificación
Monogeneos /Digeneo	Ninguno es necesario para los gusanos más pequeños; aplastar suavemente con un cubreobjeto e inundar el cubreobjeto con un fijador por un período de 5 minutos.	AFA Caliente (desde 55° a 65°C) o NBF caliente.	AFA o ETOH	Someter a tinción y montar en forma permanente en un medio de montaje.
Céstodos (*)	Agua fría (4° a 8°C) o solución salina, por un período de 1 a 12 horas; aplastar suavemente con un cubreobjeto e inundar el cubreobjeto con un fijador por un período de 5 minutos.	AFA caliente, NBF caliente o ETOH caliente.	AFA o ETOH	Someter a tinción y montar en forma permanente en un medio de montaje.
Nemátodos (*)	Ninguno es necesario para los gusanos más pequeños; extender los gusanos más grandes sosteniendo los extremos con bisturí y agregar un fijador por un período de 5 minutos.	AFA caliente o ETOH caliente	AFA, ETOH o glicerol; ETOH.	Aclarar los nemátodos más pequeños utilizando glicerol: ETOH y montar en forma permanente en jalea de glicerol. Aclarar los nemátodos más grandes y montar en forma temporal en glicerol: ETOH.
Acantocéfalo	Agua fría (4° a 8°C) o solución salina por un período de 1 a 12 horas.	AFA caliente, HBF caliente o ETOH caliente (punción de la cutícula)	AFA o ETOH	Pequeños: con tinción y montaje. Más grandes: sin tinción y montados en glicerol: ETOH.
Hirudíneos	Tricaina; pentobarbitol de sodio.	ETOH caliente	ETOH	Pequeños: con tinción y montaje. Más grandes: glicerol: ETOH.
Artrópodos	No es necesario	ETOH frío (4° a 8°C)	ETOH	Sin tinción y aclarados en KOH al 10% o un medio de montaje Hoyer.
Ciliados (**)	No aplica	Frotis secados al aire (+)	Realizar la tinción inmediatamente	Realizar la tinción utilizando tinción de Wright o Klein plateada y cubrir con un cubreobjeto en forma permanente, el cual debe contener un medio de montaje (Permunt o equivalente).
Flagelados(**)	No aplica	Frotis secados al aire	Realizar la tinción inmediatamente	Realizar la tinción utilizando una tinción de Wright y cubrir con un cubreobjeto en forma permanente, el cual debe contener un medio de montaje (Permunt o equivalente).

Amebas (**)	No aplica	Frotis secados al aire	Realizar la tinción inmediatamente	Realizar la tinción utilizando una tinción de Wright y cubrir con un cubreobjeto en forma permanente, el cual debe contener un medio de montaje (Permout o equivalente).
Mixozoos	No aplica	Frotis secados al aire	Realizar la tinción inmediatamente	Realizar la tinción utilizando una tinción de Wright y cubrir con un cubreobjeto en forma permanente, el cual debe contener un medio de montaje (Permout o equivalente).
Microsporidios	No aplica	Frotis secados al aire	Realizar la tinción inmediatamente	Realizar la tinción utilizando una tinción de Wright o Gram y cubrir con un cubreobjeto en forma permanente, el cual debe contener un medio de montaje (Permout o equivalente).

Fuente : Adaptado de Noga, 2000.

AFA : ácido acético formalina y alcohol;

MBF: formalina neutra tamponada al 10%;

ETOH: etanol al 70%;

glicerol: **ETOH**: glicerol al 100%: etanol al 70%.

- (*) Antes de comenzar el proceso de preservación, extraer de la cápsula las larvas encapsuladas en forma manual o digerir la cápsula con pepsina al 0,2% en 0,1 M HCl.
- (**) Ver la lista de problemas que se presentan en otras técnicas de diagnóstico.
- (+) Este procedimiento es mucho menos confiable en la identificación de protozoos que la histología de rutina; sin embargo puede ser muy útil al enviar especímenes a los laboratorios de referencia para su posterior identificación.

IV.2. PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS

Se presentan los procedimientos de diagnóstico para la identificación de los parásitos *Kudoa thyrsithe* (Myxosporidio) y *Nucleospora salmonis* (Microsporidio), por ser ambos parásitos, agentes causales de dos condiciones patológicas que afectan la sobrevivencia y comercialización de los peces salmónidos de cultivo en el país.

K. thyrsithe es el agente causal de la patología de “Síndrome del Tejido Blando” que afecta a la carne de los peces, provocando un grave daño a su comercialización.

N. salmonis es el agente de una condición anémica aguda, cuyos síntomas son similares a los causados por la leucemia plasmocitoídea (PL), la cual tendría un origen viral.

IV.2.1. Microsporidiosis

Los microsporidios son patógenos intracelulares obligatorios, pertenecientes al Phylum Microspora. Se les considera organismos eucarióticos primitivos porque carecen de mitocondrias, peroxisomas, membranas de Golgi y otros organelos típicos de las células eucariotas. Los parásitos se caracterizan por la estructura de esporas, que poseen un complejo mecanismo de “*estrución*” tubular, utilizado para inyectar el material infeccioso (esporoplasma) en las células. Su división nuclear es considerada primitiva. La ubicación intracelular del parásito en las células linfocíticas, el gran tamaño de sus esporas y la gran cantidad de flagelos polares, diferencian claramente a *N. salmonis* de otros miembros reconocidos del género. Barlough et al., (1995).

Los microsporidios poseen distribución mundial, con una amplia variedad de huéspedes entre animales vertebrados e invertebrados (Murray et al., 2000).

Afecta a varias especies de peces salmónidos marinos y de agua dulce, como salmón chinook de cultivo, trucha arcoiris, trucha cabeza de acero.

Cabe hacer notar que aún no está claro si la condición causada por el *N. salmonis* es la misma conocida como Leucemia Plasmocitoídea. (Kent y Poppe, 1998).

Los peces afectados pueden presentar exoftalmia uni o bilateral y extrema palidez de las branquias. Internamente se presenta una hinchazón moderada a severa de riñón y bazo, enrojecimiento e inflamación intestinal.

En preparaciones histológicas se observa abundancia de linfoblastos, las células stem infectadas poseen núcleos grandes e irregulares que contienen uno o más plasmidios (inclusiones ovoides).

La infección por *N. salmonis*, cuando se presenta en salmón chinook adultos y juveniles, se caracteriza por la anemia y una linfoblastosis aguda y crónica que tiene características parecidas a leucemia.

Los rasgos patológicos de la enfermedad son muy parecidos a los de la Leucemia Plasmocitoídea cuyo origen puede ser viral y que se ha registrado en los chinook cultivados en agua de mar en British Columbia (Kent et al., 1990).

El diagnóstico presunto se realiza mediante la observación del microsporídeo por impresiones de tejidos teñidas con Gram, o secciones histológicas.

IV.2.1.a) Preparación y tinción de frotis de órganos hematopoyéticos

- i) Cortar una sección de riñón o bazo.
- ii) Realizar las impresiones sobre un portaobjetos.
- iii) Teñir con Tinción Gram o Lieshman/Giemsa.
- iv) Observar las esporas (teñidas de azul con una vacuola central más clara)..

IV.2.1.b) Cortes Histológicos

- i) Realizar cortes de órganos hematopoyéticos
- ii) Llevar a cabo los procedimientos de fijación e inclusión en parafina como se describió en la sección de histología de este manual.
- iii) Teñir con Hematoxilina –Eosina.
- iv) Observar en microscopio, los parásitos se presentan como cuerpos esféricos eosinófilos de tamaño 2 – 4 μm dentro de los hemoblastos.

IV.2.1.c) Diagnóstico Confirmatorio

Se realiza mediante la observación de la espora en microscopía electrónica.

La prueba molecular PCR anidado (nested PCR) para el diagnóstico de este agente, fue desarrollada por Barlough et al. (1995), basada en la secuencia de DNA ribosomal. La región

amplificada corresponde a la fracción del gen que codifica la región 407 bp de un gen ARNr 16S del parásito.

Primers utilizados para la prueba PCR anidado

Primers (o iniciador)	Secuencia 5' @ 3'
Primer 1 (externo) ES-1a	CTTGTGAACCCAGACGG
Primer 2 (externo) ES-2a	TGCCTTAGTGAGACACTGTTAC
Primer 3 (interno) ES-3a	GACATTCTCTGTCCAGCGG
Primer 4 (interno) ES-4a	GAGCTAATCCTGCTCATCC

Ciclos de Amplificación de un primer y segundo PCR

	Primer PCR	Segundo PCR
Desnaturalización	1 min. a 94°C	1 min. a 94°C
Acoplamiento	2 min. a 45°C	2 min. a 45°C
Extensión	1,5 min. a 72°C	1,5 min. a 72°C
Número de Ciclos	35 ciclos	35 ciclos

IV.2.2. Myxosporidiosis, Enfermedad del Tejido Blando

Parásito Myxosporideo de amplia distribución en los océanos del mundo que afecta la musculatura de varias especies de peces marinos como atún, jurel, merluza del Pacífico, pez sol, (Moran et al., 1999)

La infección no causa mortalidad, pero cuando el pez muere el parásito libera enzimas proteolíticas que degradan la musculatura del pez.

Los peces infectados como consecuencia de la musculatura blanda y en casos extremos de la mioliquefacción de los tejidos tienen escaso valor comercial (Kent y Poppe, 1998).

K. thyrstites ha sido identificado como un problema en salmón del Atlántico de cultivo en Irlanda, Francia, Estados Unidos, Canadá y recientemente en Chile (López y Navarro, 2000; Chacko et al., 2001)

Fue reportado en salmones de cultivo en Chile por López y Navarro (2000) y en peces planos (*Paralichthys adspersus*) por Castro y Burgos (1996). No obstante, el estudio molecular realizado por Whipps et al.,(2001), sugiere que el parásito *Kudoa* aislado en Chile, en esa oportunidad, no sería *K thyrsites*.

Las esporas de *K.thyrsite* tienen forma estrellada con cuatro válvulas y cuatro cápsulas polares. Después de la infección por la etapa actinosporidea el esporoplasma migra a las fibras musculares formando los pseudoquistes, dentro de los cuales se desarrolla la etapa de espora. En infecciones más intensas puede aparecer una inflamación severa alrededor de la fibra del músculo infectado y se observan esporas liberadas dentro de los macrófagos.

IV.2.2.a) Diagnóstico Presunto

Preparación húmeda de tejido muscular y observación de esporas con forma estrellada según los siguientes procedimientos A o B.

- A- Cortar un pequeño trozo de tejido muscular del pez (0,5 x5 cm²), colocar en un portaobjeto, cubrir con otro portaobjeto y presionar. Observar en microscopio con aumento 40X.
- B- Examinar el fluido colectado desde un corte superficial de la carne.

En ambos procedimientos (A o B), se debe observar esporas con forma estrellada y cuatro cápsulas polares en cada extremo. Las esporas miden aproximadamente 13 a 15 μm de punta a punta, (Kent and Poppe, 1998).

V. ENFERMEDADES POR HONGOS

V.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

No es muy común utilizar un cultivo de hongos para el diagnóstico rutinario de enfermedades de peces porque los patógenos de hongos más comunes (Oomicetes) se pueden diagnosticar sin realizar un cultivo. No obstante, es necesario realizar cultivos para algunas enfermedades provocadas por hongos que no son muy comunes y, así, lograr un diagnóstico definitivo. Generalmente, no se realizan cultivos para los que no son Oomicetes, a menos que se observen los organismos de hongos típicos en los montajes húmedos o vía la histopatología.

En los cultivos de hongos:

- Inocular las placas con una pequeña masa (app. 12 mm³) de un tejido infectado con el hongo e incubar a temperatura ambiente.
- Una vez que se detecte el crecimiento del hongo (en general varios días después), se aconseja transferir el extremo crecido del micelium a una placa con cultivo fresco, cortando en forma aséptica una pequeña porción del agar que contenga el extremo principal de crecimiento. Esto permitirá eliminar cualquier contaminante bacteriano presente en la muestra de tejido.

Para los que no son Oomicetes, uno de los medios más útiles, que se encuentra disponible en el mercado y sirve para cualquier propósito y permite el aislamiento de casi cualquier patógeno, es el Agar de Dextrosa Sabouraud (SDA). Si se sospecha la presencia de un patógeno de hongo no Oomicete:

- Inocular las muestras de tejido en la inclinación de SDA e incubar a temperatura ambiente. Se debe tomar en cuenta el hecho que las esporas de hongos transmitidas en el aire pueden contaminar los cultivos.
- Asegurarse que el tipo de hongo aislado en el cultivo sea similar en su morfología al del tipo de hongo que se observa en la lesión.

- En el caso que el hongo no se desarrolle en el SDA, intentar con otro medio especializado o enviar las muestras a un laboratorio especializado.

La mejor forma de aislar los Oomicetes es utilizando un agar de trigo, YpSs, o cualquier otro medio con bajos nutrientes, para así inhibir el desarrollo de bacterias contaminantes. A pesar que es muy fácil aislar los Oomicetes, el cultivo de estos desde las lesiones infectadas con bacterias puede resultar muy difícil, debido a que las bacterias inhiben a los Oomicetes, en especial aquellos que presentan formas de crecimiento lentas, como por ejemplo el *Aphanomices*. En las lesiones que presentes altos índices de contaminación, agregar penicilina (app. 500 U/mL) y/o estreptomycinina (app. 0,2 µg/mL), para así mejorar los resultados. No obstante, los antibióticos pueden inhibir en gran forma algunos tipos de Oomicetes, en especial los *Aphanomices*. Dos de los géneros de Oomicetes que generalmente se aíslan desde los peces y que no presentan inhibición son *Saprolegnia* y *Achlya*.

Referencias bibliográficas

- Abbas A.K., Lichtman A.H. and Pober J.S. 1997. *Celular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Company. Third Edition USA: 494 p.
- Alonso M., Rodríguez, S. and S.I. Pérez. 1999. Nested PCVR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *Jour. of Virol. Methods*, 81:1-9.
- Austin B. and B.A. Austin (Eds). 1991. *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. John Wiley & Sons. NY 316 pp.
- Austin, B.; Bishop, L.; Gray, C.; Watt, B. and j. Dawes. 1986. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms. *Journal of Fish Diseases* 9:469-474.
- Barlough, J.E.; McDowell, T.S.; Milani, A.; Bigornia, L.; Slemenda, S.B.; Pieniazek, N.J. and R.P. Hedrick. 1995. Nested polymerase chain reaction for detection of *Enterocytozoon salmonis* genomic DNA in Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquatic. Org.* 23:17-23.
- Blake S.L., Schill W.B., McAllister P.E., Lee M., Singer J.T. and B.L. Nicholson. 1995. Detection and Identification of Aquatic Birnaviruses by PCR Assay. *J. Clin Microol.* Vol 33, N° 4:835-839.
- Castro R. and R. Burgos. 1996. *Kudoa thysites* (Myxozoa, Multivalvulida) causing “milky condition” in the musculature of *Paralichthys adspersus* (neoptergii, Pleuronectiformes, Paralichthyidae) from Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 163-164.
- Cepeda C. and Y. Santos. 2000. Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *International Microbiology*, Vol. 3(4):235-238
- Chacko, A.J. G.L. Hoffman and S. Bravo. 2001. *Kudoa Thysites* (Myxozoa, Multivalvulida) detected in the muscles of farmed Atlantic Salmon from Chile. *Abstract Book: International Conference EAFF 9-14 September, Dublin, Irlanda.*

- Denzin N. and C. Staak. 2000. Fish Immunoglobulin-A Sero-Diagnostician`s Perspective. Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.:60-64.
- Duncan R.; Mason C.L., Nagy E., Leong J. and P. Doboss. 1991. Sequence Analysis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Genome Segment B and Its Encoded VP 1 Protein:AA Putative RNA-Dependent RNA Polymerase Lacking the Gly-Asp-Asp Motif.Virology Vol.181, N°2::541-552.
- Gibello A., Blanco M.M., Moreno M.A., Cutuli M.T., Domenech A., Domínguez I. and J.F. Fernández-Garayzabal. 1999. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. Applied Environ. Microbiol. Vol 65(1):346-350
- Goede R.W. 1989. Fish health/condition assessment procedures. Part I. Utah Division of Wildlife Resources.
- Hariharan H., Qian B., Kibenge F.S., Heaney S.B.and D.J. Rainnie. 1995. Development of a specific biotinylated DNA probe for the detection of *Renibacterium salmoninarum*. Can. J.Vet.Res. 59(4):306-310.
- Humason, G.L. 1979. Animal tissue techniques. Third edition. W.H. Freeman and Co. San Francisco. USA.
- Kent M.L.; Groff J.M.; Traxler G.S.; Zinki J.G. and J.W. Bagshaw. 1990. Plasmacytoid leukemia in seawater reared chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 8: 199-209.
- Kent M.L. and T.T. Poppe. 1998. Diseases of Netpen-reared salmonid fishes. Pacific Biological Station, Nanaimo, B.C. Quadra Printers Ltda. Canadá.
- Kibenge, F.S.B.; Gárate, O.N.; Johnson, G.; Arriagada, R.; Kebenge, M.J.T.; Wadowska, D. 2001. Isolation and identification of infections salmon anemia virus (ISAV) from coho salmon in Chile. Dis. Aquat. Organ. 45>:9-18.
- Kinkelin P.D.E., Michel Ch. et P. Ghittino. 1985. Precis de pathologie des poissons .Institut National de la Recherche Agronomique. Office International des Epizooties. Paris. 348 p.
- Lannan C.N., Ewing S.A. and J. Fryer. 1991 A Fluorescent Antibody Test for Detection of the *Rickettsia* Causing Disease in Chilean Salmonids. Journal of Aquatic Animal Health Vol. 3, N° 4: 229-234.

- 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), 135
- LeJeune J.T. and Rurangirwa F.R. 2000. Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. J. Vet. Diagn. Invest.12(6): 558-61.
- Lewin B. 2000. Genes VII. Oxford University Press Inc. 990 p.
- Lopez J.C. and Navarro J. 2000. Descripción de casos clínicos producidos por nuevos agentes patógenos de importancia en salmones de cultivo en Chile. XI Congreso de Medicina Veterinaria Universidad de Chile. Jornadas de Salmonicultura, 25-27 Octubre, Puerto Varas, Chile, p.106.
- MacFaddin J. F. 1977. Biochemical tests for identification of medical bacteria. The William & William Company USA. 312 pp.
- Madigan M.T.; Matinko J.M. and J. Parker. 2000. Clinical and Diagnostic Microbiology and Immunology. In: Brock Biology of Microorganisms 9^o Edition. 867 p. Rio de Janeiro, Brasil.
- Mata M. and Y. Santos. 2001. An improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Flavobacterium psychrophylum* isolated from salmon and rainbow trout. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 21(5):195-199.
- Mjaaland S.; Rimstad E.; Falk, K.; and B.A. Dannerig B.A. 1997. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L): an orthomyxo-like virus in a teleost. J. Virol., 71:7681-7686.
- Moran. J.D.W.; Whitaker D.J. and M.L. Kent 1999. A review of the myxosporian genus *Kudoa meglitsch*, 1947 and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. Aquaculture, 172: 163-196.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashy, G.S. & Pfaller, M.A. 2000. Principios generales de diagnóstico Laboratorial En: Microbiología Médica 2000. 3^o Ed. Editorial Guanabara/Koogan, Río de Janeiro.
- Noga, J. 2000. Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. Iowa State University Press. 1st Edition 367 p..
- Office International des Epizooties. 2000. Código Sanitario Internacional para los Animales Acuáticos. Tercera edición, París Francia. 206 p.

- Office International des Epizooties. 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. 3rd edition. París Francia. 153 p.
- Olea I., Bruno, D. W. and T.S. Hastings. 1993. Detection of *Renibacterium salmoninarum* in naturally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using an enzima-linked immunosorbent assay. *Aquaculture*, 116:99-110.
- Pascho R.J., Elliott, D.G. and J.M. Streufert. 1991. Brood stock segregation of spring Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* by use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the fluorescent antibody technique (FAT) effects the prevalence and levels of *Renibacterium salmoninarum* infection in progeny. *Diseases of Aquatic Organisms* Vol. 12: 25-40.
- Rodríguez S., Vilas M.P., Alonso M.,and S.I. Pérez. 1995. Study of a viral-dual infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by seroneutralization, Western blot and polymerase Chain reaction assays. *Microbiología* Vol. 11(4): 461-470.
- Romalde J.L., .Iteman I. and E. Camiel. 1991. Use of pulsed field gel electrophoresis to size the chromosome of the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Microbiol Lett.* 68(2):217-225.
- Siwicki A.K. and M. Dunier. 1993. Quantification of antibody secreting cells to *Yersinia ruckeri* by ELISPOT assay after in vivo and in vitro immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol.* 37(1):73-80.
- Stolen J., Fletcher T.C., Anderson D.P., Roberson B.S. and W.B. van Muiswinkel (Editors). 1990. Techniques in Fish Immunology. FITC 1.1st edition. SOS Publications Fair Haven. USA.
- Tortora G.J., Funke B.R. and C.L. Case. 1997. Microbiology: An Introduction. Addison Wesley Longman, Inc. Sixth Edition. 832 p.
- Thoesen, J.C. (Ed.) 1994. Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens .Fourth Edition.
- Urdaci M.C.; Chakroun C.; Faure, D. and J.F. Bernardet. 1998. Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Favobacterium psychrophilum* *Research in Microbiology* Vol. 149, Issue 7:519-530.
- Wang W-H., McNatt L.G., Shepard A.R., Jacobson N., Nishimura D.Y., Stone E.M., Sheffield V.C. and A.F. Clark. 2001. Optimal procedure for extracting RNA from human ocular

tissues and expression profiling of the congenital glaucoma gene FOXC1 using quantitative PCR. *Mol. Vis* :89-94.

Wilklund T.; Madsen, L.; Bruun M.S. and I. Dalsgaard. 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology*, 88:299-307.

Whipps C.; Smith P. and M Kent. 2001. A *Kudoa* species in pen-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*) from Chile. *FHS Newsletter*. Volume 29(1).

APÉNDICE

I.- MEDIOS DE CULTIVO, TINCIONES Y SOLUCIONES DE USO FRECUENTE.

II.- KITS DE DIAGNOSTICO: PROVEEDORES

**I.- MEDIOS DE CULTIVO, TINCCIONES Y SOLUCIONES DE USO
FRECUENTE**

INDICE

<u>MEDIOS DE CULTIVO</u>	3
<u>Medios de cultivo sólidos</u>	3
<u>TSA (Tryptic Soy Agar)</u>	3
<u>Agar Citofaga (CA)</u>	3
<u>Agar Shieh</u>	3
<u>KDM-C</u>	4
<u>KDM-2</u>	4
<u>Medio SW</u>	4
<u>Agar Aeromonas</u>	5
<u>Medio Waltman & Shotts</u>	5
<u>Medio S-KDM</u>	5
<u>Agar MAOA</u>	6
<u>Agar TSI</u>	6
<u>Medio O/F</u>	7
<u>Gelatina</u>	7
<u>Medios de cultivo Líquidos</u>	7
<u>Caldo Koser Citrato</u>	7
<u>Caldo Lactosado</u>	7
<u>Caldo Nitratado</u>	8
<u>Caldo Nutritivo</u>	8
<u>Caldo Peptonado</u>	8
<u>Caldo Sabourand</u>	8
<u>Suero Fisiológico</u>	8
<u>TINCIONES</u>	9
<u>Tinción GRAM</u>	9
<u>Tinción GIEMSA</u>	10
<u>ACRIDINA ORANGE</u>	11
<u>Tinción Esporas</u>	11
<u>Fucsina Básica</u>	11
<u>Verde Malaquita</u>	11
<u>Tinción de Ziehl Nielsen</u>	11
<u>PRUEBAS BIOQUIMICAS</u>	12
<u>Hidrólisis de la Gelatina</u>	12
<u>Producción de Indol a partir de Triptofano</u>	12
<u>Producción de H₂S</u>	12
<u>Producción de Amonio a partir de Urea</u>	12
<u>Reducción de Nitrato</u>	13
<u>Hidrólisis del Almidón</u>	13

<u>Prueba de Voges – Proskauer</u>	13
<u>Producción de Gas y Ácidos a partir de Lactosa</u>	13
<u>Utilización de Citrato como única fuente de Carbono</u>	14
<u>Hidrólisis de Lecitina</u>	14
<u>Prueba de la Catalasa</u>	14
<u>Prueba de la Oxidasa</u>	14
<u>Reactivos Pruebas Bioquímicas</u>	15
<u>Ehrlich – Kovacs</u>	15
<u>Frazier</u>	15
<u>Griess – Ilvay's</u>	15
<u>Rojo Metilo</u>	16
<u>Solución de montaje para inmunofluorescencia</u>	16
<u>SOLUCIONES</u>	16
<u>Medio de cultivo enriquecido para células de peces</u>	16
<u>MEM-10</u>	16
<u>Tripsinización de células</u>	16
<u>Tampón Tris (1 M)</u>	17
<u>PBS</u>	17
<u>FIJADORES</u>	17
<u>A.F.A.</u>	17
<u>ELISA</u>	18
<u>Phosphate Tamponed Saline (PBS)</u>	18
<u>Tween 20 + Tris Tampóned Saline (TTBS)</u>	18
<u>Acido 2,2-Azinobis (3-EtilBenzoTiazolina Sulfonico) (ABTS)</u>	18
<u>Tampón de ácido cítrico</u>	19
<u>Tampón de cobertura</u>	19
<u>PCR</u>	19
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	20

MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo sólidos (para crecimiento)

TSA (Tryptic Soy Agar)

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

Agar Citofaga (CA)

Ajustar a pH 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

Agar Shieh

Ajustar a pH 7,2

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

KDM-C

para aislamiento de *Renibacterium salmoninarum*, ajustar a pH 6,8

Peptona	1	g
Extracto levadura	0,05	g
L-Cisteína HCl	0,1	g
Carbón activado	0,1	g
Agar	1,5	g
Agua destilada	100mL	

Disolver los ingredientes y calentar hasta disolver. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C.

KDM-2

para crecimiento de *Renibacterium salmoninarum*

Peptona	1	g
Extracto de levadura	0,05	g
Cisteína 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 minutos. Enfriar a 45°C y adicionar 100 mL de suero bovino fetal.

Medio SW

para aislar *Yersinia ruckeri*.

Triptona	2	g
Extracto levadura	2	g
Tween 80	10	mL
NaCl	5	g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,1	g
Azul bromotimol	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.

Agar Aeromonas

(Ryan) (Medio Comercial Oxoid, Difco, Merck)

Xilosa	3,75 g/L
Lactosa	1,5 g/L
Inositol	2,5 g/L
Sorbosa	3 g/L
L – lisina HCl	3,5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Proteosa peptona	5 g/L
Tiosulfato de sodio	10,67 g/L
Sales biliares Oxoid N°3	3 g/L
Citrato de Amonio férrico	0,8 g/L
Cloruro de Sodio	5 g/L
Azul de bromotimol	0,04 g/L
Azul de timol	0,04 g/L
L – arginina HCl	2 g/L
Agar	12,5 g/L
Agua destilada	1 L

Hidratar y calentar hasta disolver. Ajustar pH 8,0 +/- 0,1. Enfriar a 50° C y agregar Ampicilina a una concentración final de 5 mg/L.

Medio Waltman & Shotts

	%(p/v)
CaCl ₂ H ₂	0,01 g
NaCl	0,05 g
Tween 80	1,0 g
Triptona	0,2 g
Extracto de levadura	0,2 g
Azul bromotimol	0,0003 g
Agar	1,5 g
Sucrosa	0,5 g
Ajustar a pH 7,4	

Medio S-KDM

Peptona	10 g/L
Extracto de levadura	0,5 g/L
Agar	12 g/L
L-cisteína HCl	1 g/L

Agua destilada 900 mL

Mezclar y disolver calentando. Ajustar pH 6,5. Autoclavar 115°C por 20 minutos. Enfriar a 45° C y adicionar 100 mL de suero fetal de becerro(*), y los antibióticos en las concentraciones finales que se señalan:

Sulfato de polimixina B	0,00125%
Ac. Oxolínico	0,00025%
Ciclohexamida	0,005%
D-cicloserina	0,00125%

(*) El suero fetal puede reemplazarse por carbón activado.

Agar MAOA

Ajustar a pH: 7.2
(Modificado Anacker y Ordal)

Peptona	0.5	g
Acetato de Sodio	0.001	g
Extracto de Levadura	0.05	g
Agar	1.5	g
Agua destilada	100	mL

Disolver todos los ingredientes en un poco de agua destilada .
Llevar a 100 mL.

Medios de Cultivo (Determinativos)

Agar TSI

(Triple Sugar Iron)

Medio disponible en el mercado. DIFCO, BBL, OXOID, MERCK.

Se disuelve la cantidad indicada, en agua destilada. Se distribuye en tubos de ensayo, se autoclavan y enfrían inclinados.

Medio O/F

Ajustar a pH $6,8 \pm 0,2$

Triptona	2 g
NaCl	5 g
Fosfato dipotásico	0,3 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	2 g
Agua destilada	1.000 mL

Gelatina

Ajustar a pH $6,8 \pm 0,2$

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 mL

Medios de cultivo Líquidos

Caldo Koser Citrato

Medio para detectar la utilización de citrato como única fuente de carbono.

Citrato de sodio	2 g
MgSO ₄	0,2 g
Na(NH ₄)HPO ₄	1,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g

Ajustar a pH: 7,0

Caldo Lactosado

Medio para detectar la producción de ácidos y gases

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Lactosa	5 g

Ajustar a pH: 6,0 – 7,0

Caldo Nitratado

Medio para detectar la reducción de nitratos

caldo peptonado	1000 mL
KNO ₃	0,2 g

Ajustar a pH: 7,2

Caldo Nutritivo

Medio típico de crecimiento

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g

Ajustar a pH: 7,0 – 7,5

Caldo Peptonado

Medio típico de crecimiento

Peptona	10 g
NaCl	5 g

Ajustar a pH: 7,2

Caldo Sabourand

Medio para aislar hongos o levaduras

Peptona	10 g
D-Glucosa	40 g

Ajustar a pH: 5,0

Suero Fisiológico

Para preparar disoluciones y frotis

NaCl	8,5 g
H ₂ OD	1000 mL

Preparación: Todos los medios de cultivos anteriormente indicados se preparan de la siguiente manera:

- se mezclan los ingredientes con agua destilada
- se calienta la mezcla unos minutos hasta la disolución completa
- a continuación se distribuyen los medios en recipientes adecuados, para luego esterilizar en Autoclave a 120° C por 20 minutos.

Nota: Para otros medios de cultivo consultar los manuales citados en la bibliografía.

Los medios con azúcares deben ser esterilizados (por la técnica de vapor fluyente) autoclave 20' a 120° C o por filtración.

Productos disponibles en el mercado:

DIFCO: Tryptone broth

BBL : Trypticase broth

Se prepara un medio que contenga un 1% de Tryptona.

TINCIONES

Tinción GRAM

Reactivos

Cristal Violeta

Para tinción simple y tinción Gram

cristal violeta	0,5 g
Agua destilada	100 mL

Mezclar bien y luego filtrar

Lugol

Para tinción Gram y detección de amilasas

Yodo	1 g
Yoduro de Potasio	2 g
Agua destilada	300 mL

Pulverizar en un mortero el yodo y yoduro de potasio, luego añadir agua destilada hasta completar 300 mL. Filtrar.

Safranina

Para tinción Gram

Safranina	1 g
Etanol de 95%	10 mL
Agua destilada	90 mL

Disuelva la safranina en etanol y luego afores a 100 mL con agua destilada. Filtrar.

Alcohol decolorante

Etanol	95 mL
Acetona	5 mL

Procedimiento

- Preparar un frotis y fijarlo al calor
- Colocar solución de cristal violeta durante 1 minuto
- Lavar con agua corriente durante algunos segundos
- Cubrir el portaobjetos con solución yodada durante 30 segundos.
- Lavar con agua corriente unos 15 segundos
- Decolorar por 30 segundos con alcohol decolorante
- Lavar con agua corriente
- Secar y examinar al microscopio con objetivo de inmersión.

Resultado:

- Microorganismos Gram positivos se tiñen color azul
- Microorganismos Gram negativos se tiñen rojo.

Tinción GIEMSA

Método I

- 1.- Diluir la solución básica de Giemsa inmediatamente antes de usar (1 gota por ml de agua destilada)
- 2.- Sumergir el tejido fijado en la solución recién preparada
- 3.- Dejar durante 15 minutos a 1 hora
- 4.- Enjuagar con agua corriente y dejar secar
- 5.- Sumergir 5 segundos en acetona y dejar secar

Método II (rápido)

- 1.- Preparar una solución 1:1 con Giemsa y metanol
- 2.- Dejar caer gota a gota esta solución sobre la preparación
- 3.- Teñir durante 2 a 5 minutos
- 4.- Lavar con agua y dejar secar

ACRIDINA ORANGE

Ajustar a pH. 3.5 (para Piscirickettsias)
Acridina Orange 20 mg
Acetato de Sodio Tampón 190 mL
Acetato de Sodio tampón: 100 ml 1 M CH₃COONa x 3H₂O
90 ml 1 N HCl

Ajustar el pH con HCl.

Almacenar en botella oscura a temperatura ambiente.

Observación:

Las muestras deben secarse al aire y fijarlas con metanol absoluto.

Observar en microscopio de epifluorescencia

Rickettsias; Se tiñen color Rojo-naranja o verde

Tinción Esporas

Fucsina Básica

Para tinción de esporas

Fucsina básica 0,1 g
Etanol de 95% 10 mL
Agua destilada 90 mL
Disuelva la fucsina básica en etanol y luego a 100mL con agua destilada. Filtrar.

Verde Malaquita

Para tinción de esporas.

Verde malaquita 0,5 g
Agua destilada 100 mL

Mezclar bien y luego filtrar.

Tinción de Ziehl Nielsen

(Tinción Acido Resistente).

Procedimiento:

Fijar el frotis al calor

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

Lavar con agua corriente

Secar y examinar con objetivo de inmersión

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Hidrólisis de la Gelatina

Sembrar la bacteria problema en placas de Agar-Gelatina por puntos compactos. Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 2 – 14 días.

Resultado: Agregue a la placa 1 – 2 mL del reactivo de Frazier.

Prueba positiva: Halo transparente en torno a la colonia.

Prueba negativa: Precipitado de color blanco alrededor de la colonia.

Producción de Indol a partir de Triptofano

Sembrar la bacteria problema en Caldo Peptonado. Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 2 – 7 días.

Resultado: Agregue 1 mL de xilol al tubo. Agite. Espere unos 30 segundos. Agregue algunas gotas de Reactivo de Ehrlich-Kovacs dejándolas deslizarse por las paredes del tubo hasta la capa de xilol.

Prueba positiva: Coloración rojo cereza en la capa de xilol.

Prueba negativa: Ausencia de coloración.

Producción de H₂S

Sembrar la bacteria problema en tubos de Agar Acetato de Plomo con asa recta, picando al fondo del tubo y retirándola linealmente por la superficie del agar. Incubar a la temperatura óptima de crecimiento, por un tiempo de hasta 7 días.

Resultado: Prueba positiva: Ennegrecimiento del medio.

Prueba negativa: Ausencia de coloración.

Producción de Amonio a partir de Urea

Sembrar la bacteria problema en tubos de Agar Christensen Urea con asa recta, picando al fondo del tubo y retirándola linealmente por la superficie del agar. Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 1 – 7 días.

Resultado: Prueba positiva: Coloración del medio.

Prueba negativa: Ausencia de coloración.

Reducción de Nitrato

Sembrar la bacteria problema en Caldo Nitrado.
Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 2 – 7 días.

Resultado: Agregar 1 mL de los Reactivos de Griess-Hosvay's 1 y 2 al tubo.

Prueba positiva: Coloración roja del medio.

Prueba negativa: Ausencia de coloración.

Hidrólisis del Almidón

Sembrar la bacteria problema en placas de Agar Almidón por puntos compactos.
Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 2 – 14 días.

Agregue a la placa 1 – 2 mL de Lugol (la empleada en tinción Gram).

Prueba positiva: Halo transparente en torno a la colonia.

Prueba negativa: Presencia de color violeta, correspondiente al complejo lugol-almidón.

Prueba de Voges – Proskauer

Con esta prueba se detecta la presencia de acetona o acetyl-metil-carbinol, intermediario de la formación del alcohol 2,3 butileno glicol.
Sembrar la bacteria problema en Caldo de Clark-Lübs.
Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 2 – 7 días.

Resultado: Vacíe 1 mL del cultivo a un tubo de Hemólisis.

Agregue 0,5 mL de los Reactivos A (sol. Alcohólica de L-naftol al 6%)
B (sol. Acuosa de KOH al 16%).

Agite el tubo y luego déjelo reposar por 30 minutos.

Prueba positiva: Coloración roja encarnada del medio.

Prueba negativa: Ausencia de coloración.

Producción de Gas y Ácidos a partir de Lactosa

Sembrar la bacteria problema en tubos con Caldo Lactosado provistos de Campana de Durham.
Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 2 – 7 días.

Resultado: En caso que haya producción de gas se apreciará dentro de la Campana de Durham una burbuja. En caso contrario no hay producción de gas. Para detectar la producción de ácido agregue al tubo unas 5 gotas de una solución de Rojo Metilo.

Prueba positiva: Coloración roja del medio.

Prueba negativa: Ausencia de coloración.

Utilización de Citrato como única fuente de Carbono

Sembrar la bacteria problema en tubo con Caldo Koser citrato (contiene como única fuente de carbono citrato de sodio) con asa recta. El inóculo conviene tomarlo de un medio líquido.

Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 7 días.

Resultado: Prueba positiva: El crecimiento en el medio se denota por la turbidez de éste

Prueba negativa: Transparencia del medio.

Hidrólisis de Lecitina

Incubar la bacteria problema en placas de Agar Yema de Huevo estriando una vez a través de la superficie del medio.

Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 1 – 4 días.

Resultado: Prueba positiva: Se forma un halo transparente alrededor del crecimiento microbiano.

Prueba negativa: Ausencia de halo.

Prueba de la Catalasa

Se detecta la presencia de la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno libre.

Incubar la bacteria problema en tubos con Caldo Nutritivo.

Incubar a la temperatura óptima de crecimiento por 1 – 2 días.

Resultado: Tome 1 mL de cultivo y vacíelo a un tubo de Hemólisis. Añada 1 mL de H_2O_2 (10 vol.)

Prueba positiva: Efervescencia producida por la liberación de O_2 .

Prueba negativa: No hay efervescencia.

Prueba de la Oxidasa

Disponible en el mercado (MERCK, OXOID, SIGMA).

Reactivos Pruebas Bioquímicas

Ehrlich – Kovacs

Para detectar la producción indol.

p- Dimetil aminobenzaldehido	5 g
Alcohol isoamilico	75 mL
HCl concentrado	25 mL

Disuelva el aldehido en el alcohol, luego añada lentamente el ácido. Filtrar.

Frazier

Para detección de proteasas

HgCl ₂	15 g
HCl concentrado	20 mL
Agua destilada	100 mL

Disuelva el MgCl₂ en el ácido y luego afore a 100 mL con agua destilada. Filtrar.

Griess – Ilovay's

Para detectar la producción de nitritos.

Reactivo I.

Acido sulfanilico	0,8 g
Acido acético 5 N	100 mL

Mezclar bien y luego filtrar

Reactivo II

L – naftilamina	0,5 g
Acido acético 5 N	100 mL

Mezclar bien y luego filtrar.

INDICADORES

Rojo Metilo

Para detectar la producción de ácidos.

Rojo metilo	0,02 g
Etanol de 95%	60 mL
Agua destilada	40 mL

Disuelva el rojo metilo en alcohol y luego afore a 100 mL con agua destilada. Filtrar.

Solución de montaje para inmunofluorescencia

Glicerol	90%
Tampón	10%
Tampón:	0,5 M Tampón carbonato / bicarbonato, pH 9,7 0,4 M Na_2CO_3 0,4 M NaHCO_3

VIROLOGIA

Soluciones

Medio de cultivo enriquecido para células de peces

Producto disponible en el mercado bajo en 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/Estreptomicina	5 mL
L-glutamina	5 mL

Tripsinización de células

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

Tampón Tris (1 M)

Tris-Hidrochloridoe (ácido)	106,4 g
Tris-Tampón	39,4 g
Agua bidestilada, aforar a	1000 mL

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

PBS

Ajustar a pH 7.3

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Medir aproximadamente 800 mL de agua destilada y agregar los ingredientes de a uno, disolviendo por medio de agitación. Ajustar el pH con HCl. Agregar el resto de agua hasta aforar a un litro.

Fijadores

Bouin

Acido pícrico (sol. Acuosa saturada)	75 mL
Formalina (40 %)	25 mL
Acido acético	5 mL

Disolver el ácido pícrico calentándolo (sin hervir). Dejar enfriar antes de mezclar con la formalina y el ácido acético. No congelar ni refrigerar.

A.F.A.

Acido acético	5 mL
Formalina	10 mL
Etanol al 85 %	85 mL

Formalina Tamponada

Ajustar a pH 7.0

Formalina	100 mL
Agua destilada	900 mL
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (Fosfato de Na monobásico)	4 g
Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sodio dibásico)	6.5 g

Disolver los ingredientes en un poco de agua destilada .
Agregar el resto de agua y la formalina.

ELISA

Soluciones:

Phosphate Tamponed Saline (PBS)

PBS 0,01 M ajustar a pH 7,2

7,5	g	NaCl
0,245	g	KH ₂ PO ₄ (monobásico)
0,809	g	Na ₂ HPO ₄ (dibásico)
1.000	mL	H ₂ O csp

Tween 20 + Tris Tampóned Saline (TTBS)

Ajustar a pH 8,0

60,7	g	Tris Base
4,09	g	EDTA
87,0	g	NaCl
10	L	H ₂ O (agua destilada y desmineralizada)

Agregar 10 mL de Tween 20
Ajustar el pH a 8,0, con aproximadamente 10 mL de HCl

Acido 2,2-Azinobis (3-EtilBenzoTiazolina Sulfonico) (ABTS)

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

Tampón de ácido cítrico

Ajustar a pH 4,0

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

Tampón de cobertura

Ajustar a pH:9.6

Se prepara fresco para cada ELISA.
Carbonato de Sodio para un litro,

1.59	g	Na_2CO_3
2.93	g	NaHCO_3
0.10	g	Timerosal

Almacenar a temperatura ambiente y desechar al cabo de 30 días.

PCR

Tampón 5X:

	250 Mm	Tris-HCl
	375 mM	KCl
	15 mM	MgCl_2
DTT	100 mM	

10 μl de DNA amplificado es analizado en gel de agarosa al 2% en tampón TAE(40 mM Tris acetato/1mM EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) conteniendo 1 mg por 50mL de bromuro de etidio.

Disponible en el Mercado nacional (GIBCO, MERCK, BIOS CHILE)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Krieg, N.R. and Holt (Eds). 1984. Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1 y 2. Williams & Williams Co. U.S.A.
- McFaddin, J.F. 1977. Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria. Waverly Press. Inc. U.S.A. 312 pp.
- Merck. 1990. Manual de Medios de Cultivo. Merck-Igoda División Diagnóstico. Barcelona. 356 pp.
- Seeley, H.W. 1973. Manual de Laboratorio para microbiología. Microbios en Acción. Editorial Blume.
- Toranzo, A.E. and Baria, J.L. 1993. Fry Mortality Syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13(1)30-31.

II.- KITS DE DIAGNOSTICO: PROVEEDORES

KITS DE DIAGNOSTICO

En la consulta realizada a los cinco laboratorios que realizan el mayor porcentaje de diagnóstico de enfermedades de organismos acuáticos de cultivo en Chile, se pudo constatar que existe una alta frecuencia de uso de kits de diagnóstico, especialmente en el caso de las técnicas inmunológicas como IFAT y ELISA.

Los usuarios de técnicas moleculares como PCR y RT-PCR para diagnóstico de patógenos de organismos acuáticos, también cuentan con kits comerciales que permiten dar respuestas rápidas.

Por otro lado, los métodos tradicionales de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias, están siendo reemplazadas por kits para tal efecto. En este sentido, la totalidad de los laboratorios consultados hace uso del sistema Api en sus distintas modalidades.

Los laboratorios de diagnóstico chilenos disponen de estos kits comerciales en el mercado nacional, siendo los principales proveedores para Chile los que se mencionan en el siguiente cuadro:

Proveedores Nacionales de Kits para Diagnóstico de Enfermedades de Salmónidos

Proveedor	Tipo de Kit	Dirección
BiosChile I.G.S.A.	Técnicas inmunológicas IFAT, ELISA, Moleculares, PCR.	Avda. Marathon 1943, Santiago. fono (02) 238 18 78 fax (02) 239 42 50 E-mail: ventas@bioschile.cl
Diagxotics®, Inc. Distribuidor en Chile: Carlos Rivas Padilla y Cia. Ltda.	Técnicas inmunológicas, ELISA molecular, PCR.	P.O. Box 16589 Correo 9, Santiago f/f (02) 292 11 49 (02) 292 65 49 E-mail: rilab@entelchile.net
BioMerieux Chile S.A.	Pruebas Bioquímicas, API system	Avda. Manuel Montt 2559, Ñuñoa, Santiago. fono: (02) 274 90 50 fax: (02) 274 41 48

En este anexo se presenta una recopilación realizada a través de las páginas web de los principales proveedores de kits comerciales mencionados por los laboratorios que hacen uso de ellos.



DiagXotics, Inc

"Protecting Aquaculture from Conception to Consumption"

DIAGNOSTIC TEST KITS FOR FINFISH

- HOME
- SHRIMP
- FINFISH
- RUMINANTS
- LAB SERVICES
- PRICING
- ORDER
- GENERAL INFO
- FAQ
- TIPS/ TROUBLESHOOTING
- ABOUT US
- PRESSROOM
- CONTACT US
- INDUSTRY LINKS

Monoclonal Antibody Based Tests by Format

DNA Based

Disease	ELISA		ICA	Primers for PCR
	Field Test	Lab Test		
BKD <i>Renibacterium salmoninarum</i>	X	X	X	X
Furunculosis <i>Aeromonas salmonicida</i> (Identifies typicals & atypical)	X	X		
SRS <i>Piscirickettsia salmonis</i>	X	X		X
IPNV <i>Infectious pancreatic necrosis virus</i>	X	X	X	

[Home](#) [Order](#) [About Us](#) [Contact Us](#)

Kits de Análisis de Campo basado en ELISA

DISPONIBLES PARA

Agente Patógeno	Kit
BKD*	KwikDirect®
Furunculosis	ForunKwik™
SRS	RicKwik™
IPNV	IPNVKwik™

***Aprobado por la USDA**

- Kit con todo incluido; completo y listo para usar
- Mayor uniformidad y especificidad definida
- Lotes de producción consistentes que proporcionan resultados de diagnósticos confiables, año tras año
- Eliminación de falsos positivos; sin reacción cruzada
- Puede ser utilizado con el fluido ovárico y el suero, así como con el riñón
- Resultados semi-cuantitativos en 1 hora y 40 minutos

MATERIALES Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Tubos recubiertos con Anticuerpo Monoclonal	Solución de Lavado
Biotina Rotulada con Anticuerpo Monoclonal	Tween 20
Conjugado de HRP	Gotero de 30 ml
Stop Buffer	Solución ABTS
Buffer de Dilución de Muestra	Controles Positivos Fuerte, Bajo
Peróxido de Hidrógeno	Hisopos de algodón
Tubo Cónico de 15 ml	Folleto de Instrucción

ELISA de Campo-Resumen del Procedimiento

[Página Principal](#)

[Pedido](#)

[Información de
DiagXotics](#)

[Contáctenos](#)

Kits de Análisis de Laboratorio basado en ELISA

DISPONIBLES PARA

Agente Patógeno	Kit
BKD*	KDtect®
Furunculosis	FurunDtect™
SRS	RicDtect™
IPNV	IPNVDtect™

* Aprobado por la USDA

- Kit con todo incluido; completo y listo para usar
- Mayor uniformidad y especificidad definida
- Lotes de producción consistentes que proporcionan resultados de diagnósticos confiables, año tras año
- Eliminación de falsos positivos; sin reacción cruzada
- Puede ser utilizado con el fluido ovárico y el suero, así como con el riñón
- Resultados cuantitativos en 2 horas y 40 minutos

MATERIALES Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Placa de 96 celdas recubierta de Anticuerpo Monoclonal	Solución de Lavado
Anticuerpo Monoclonal Ligado a la Biotina	Tween 20
Streptavidina-HRP	Buffer de Dilución de Muestras 5X
Stop Buffer	ABTS Solución
Peróxido de Hidrógeno	Antígeno Control Positivo Fuerte, Medio, Bajo
Folleto de Instrucción	

ELISA de Laboratorio-Resumen del Procedimiento

[Página Principal](#)

[Pedido](#)

[Información de
DiagXotics](#)

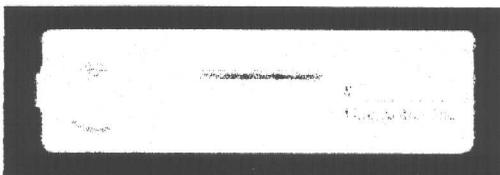
[Contáctenos](#)

Nuevo en el 2001

FishStix™

Kit de análisis individuales para la detección de:

- **Virus Infeccioso de Necrosis Pancreática (IPNV)**
- ***Renibacterium salmoninarum* (BKD)**
- ***Piscirickettsia salmonis* (SRS)**



- Line on left appears when test is positive for pathogen
- Line on right is the built-in control

Basado en un sistema de Ensayo Inmunocromatográfico (ICA) que utiliza Anticuerpos Monoclonales de propiedad de DiagXotics.



- » Información en Tiempo Real
- » Un solo paso, fácil de usar
- » No requiere equipos adicionales
- » Preparación de la muestra en 1 minuto
- » Resultados en 15 minutos
- » Almacenaje a Temperatura Ambiente; 18 Meses de tiempo de duración
- » Puede ser utilizado con fuentes de muestra pequeñas, incluyendo muestras de tejido sólidas y líquidas
- » De fácil interpretación
- » Sensible y exacto

Usos y Beneficios

- » Análisis Pen-side (para realizarlo junto a net-pens)
- » Análisis individual o de grupo
- » Un solo kit para uso de Campo o Laboratorio
- » Detección de patógenos del salmón desde alevinaje hasta
- » Simple de usar y de interpretar los resultados
- » No requiere habilidades técnicas
- » Todos los reactivos vienen en botellas tipo gotero listas para

engorde

» Herramienta rentable de manejo para la detección e información temprana

uso:

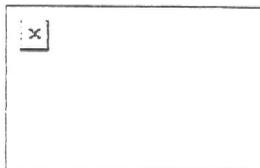
- » No necesita refrigeración
- » Control incorporado para cada análisis
- » Herramienta de selección para prevenir la transmisión vertical

[Página Principal](#)

[Pedido](#)

[Información de
DiagXotics](#)

[Contáctenos](#)



Kit de Primer Simplex

Para la detección del ADN genómico de
Renibacterium salmoninarum,
Piscirickettsia salmonis

Agentes causantes de:
Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD)
Salmonid Rickettsia Septicemia (SRS)

Kit de Primer Simplex de un Solo Paso para la Detección del ADN Genómico

- » Formato de un solo paso, un tubo, fácil de seguir
- » Máxima sensibilidad debido al pequeño tamaño del amplicon (202bp)
- » Resultados en solamente 3 horas
- » 12 meses de tiempo de duración
- » Disponibilidad de múltiples formatos de kits para cubrir todas las necesidades de nuestros clientes

El *R. salmoninarum* y el *P. salmonis* puede producir grandes pérdidas, pero más frecuentemente causa enfermedades crónicas que ocasionan serias reducciones en las ganancias debido al decrecimiento de la tasa de conversión alimenticia, el incremento de costos de mano de obra, la predisposición a otros patógenos y las pérdidas por diferencias de calidad en la cosecha.

USOS y BENEFICIOS

- Selección de reproductores en el desove para prevenir la transmisión vertical;
- Monitoreo de alevines para prevenir la dispersión en toda la instalación
- Monitoreo de juveniles durante el engorde para una detección temprana que permita una intervención rentable

- Confirmación de resultados por medio de análisis basados en anticuerpos
- Análisis más sensible disponible en la actualidad

El Kit PCR de Primer Simplex
está disponible en 3 formatos:

Básico
Regular
Super Combo

Simplex-Componentes de Kit

[Página Principal](#)

[Pedido](#)

[Información de](#)
[DiagXotics](#)

[Contáctenos](#)

DiagXotics®, Inc

"Protegiendo la Salud de los Animales Acuáticos
de la Concepción del Consumo"

Kits de Análisis de Diagnóstico para Peces

Enfermedades	Basado en Anticuerpo Monoclonal			Basado en ADN
	Análisis de Campo	Elisa		Kits de Primer para PCR
		Análisis de Lab	ICA	
BKD <i>Renibacterium salmoninarum</i>	X	X	X	X
Furunculosis <i>Aeromonas salmonicida</i> (Identifica tipicos & atipicos)	X	X		
SRS <i>Piscirickettsia salmonis</i>	X	X		X
IPNV <i>Virus de necrosis pancreática infecciosa</i>	X	X	X	

Basado en ADN

Kits de Primer Simplex para PCR BKD,SRS Pedido

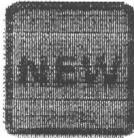
Basado en Anticuerpo Monoclonal

ELISA Field BKD, Furunculosis, IPN, SRS Pedido

ELISA Lab BKD, Furunculosis, IPN, SRS Pedido

FishStix™-ICA BKD, IPN Pedido

[Página Principal](#)[Pedido](#)[Información de
DiagXotics](#)[Contáctenos](#)



Simplex Primer Kits

AVAILABLE FOR for the detection of genomic DNA from
Renibacterium Salmoninarum,
Piscirickettsia salmonis

causative agents of
Bacterial Kidney Disease (BKD),
Salmonid Rickettsia Septicemia (SRS)

A One-Step Simplex Primer Kit for PCR Detection of Genomic DNA

- » One step, one tube, easy to follow format
- » Maximum sensitivity due to small amplicon size (202bp)
- » Results in only 3 hours
- » 12 month shelf life
- » Multiple kit formats available to meet all customer needs

Containing our New Salmonid Specific Internal Control

- Verifies that DNA is present and intact
- Ensures that PCR setup is correct and that amplification has occurred
- Included in primer solution - no extra steps required

R. salmoninarum and *P. salmonis* can cause acute animal losses, but more often results in serious profit reduction due to decreased feed conversion rates, increased labor costs, predisposition to other pathogens and loss in carcass value at harvest.

USES and BENEFITS:

- Broodstock screening at spawning to prevent vertical transmission
- Monitor in hatchery to prevent spread throughout facility

intervention

- Confirmation of antibody based test results
- Most sensitive test available

Our Simplex Primer Kit for PCR
is available in 3 Kit Formats:

Basic
Regular
Super Combo

Simplex Kit Components

[Home](#)

[Order](#)

[About Us](#)

[Contact Us](#)

ELISA Format Field Test Kits For:

Pathogen	Test Kit
BKD*	KwikDirect®
Furunculosis	FurunKwik™
SRS	RickKwik™
IPNV	IPNVKwik™

*USDA Approved

- All inclusive kits; complete and ready to use
- Dependable uniformity and defined specificity
- Consistent production lots result in reliable diagnostics
- Elimination of false positives; no cross-reactions
- Can be used with ovarian fluid and serum, as well as kidney
- Semi-quantitative results in 1 hour and 40 minutes

MATERIALS AND REAGENTS INCLUDED IN THE KIT

Monoclonal Antibody Coated Test Tubes	Wash Solution
Monoclonal Antibody Biotin Labeled	Tween 20
HRP Conjugate	30 ml Dropper Bottle
Stop Buffer	ABTS Solution
Sample Dilution Buffer	Positive Controls-High, Low
Hydrogen Peroxide	Cotton Swabs
15 ml Conical Tube	Instruction Booklet

ELISA Field Format-Outline of Procedure

[Home](#)

[Order](#)

[About Us](#)

[Contact Us](#)

ELISA Format Laboratory Test Kits For:

Pathogen	Test Kit
BKD*	KDteect®
Furunculosis	FurinDteect™
SRS	RicDteect™
IPNV	IPNVDirect™

***USDA Approved**

- All inclusive kits; complete and ready to use
- Dependable uniformity and defined specificity
- Consistent production lots resulting in reliable diagnostics
- Elimination of false positives; no cross-reactions
- Can be used with ovarian fluid and serum, as well as kidney
- Quantitative results in 2 hours and 40 minutes

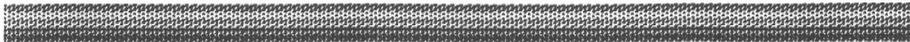
MATERIALS AND REAGENTS INCLUDED IN THE KIT

Monoclonal Antibody Coated 96 Well Plate	Wash Solution
Monoclonal Antibody Biotin Labeled	Tween 20
HRP Conjugate	5X Sample Dilution Buffer
Stop Buffer	ABTS Solution
Hydrogen Pyroxide	Positive Controls-High, Middle, Low
Instruction Booklet	

ELISA Laboratory-Outline of Procedure[Home](#)[Order](#)[About Us](#)[Contact Us](#)



Kits de Análisis de Diagnóstico
 DISPONIBLES PARA
Síndrome de Rickettsia del Salmón



Anticuerpo Monoclonal basado en ELISA para la Detección de **Síndrome de Rickettsia del Salmón** en Salmón y Trucha

Análisis de Campo
Por Análisis de Laboratorio, uso RicDtect

- Kit con todo incluido; completo y listo para usar
- Mayor uniformidad y especificidad definida
- Lotes de producción consistentes que proporcionan resultados de diagnósticos confiables, año tras año
- Eliminación de falsos positivos; sin reacción cruzada
- Puede ser utilizado con el fluido ovárico y el suero, así como con el riñón
- Resultados semi-cuantitativos en 1 hora y 40 minutos

MATERIALES Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Tubos recubiertos con Anticuerpo Monoclonal	Solución de Lavado
Biotina Rotulada con Anticuerpo Monoclonal	Tween 20
Conjugado de HRP	Gotero de 30 ml
Blue Stop	K Blue Max
Buffer de Dilución de Muestra	Controles Positivos Fuerte, Bajo
Tubo Cónico de 15 ml	Hisopos de algodón
Folleto de Instrucción	

RicKwik-Resumen del Procidimento

FurunKwik™

Kits de Análisis de Diagnóstico

DISPONIBLES PARA

Furunculosis

Anticuerpo Monoclonal basado en ELISA para la
Detección de *Furunculosis* en Salmón y Trucha

Análisis de Campo Por Análisis de Laboratorio, uso FurunKit

- Kit con todo incluido; completo y listo para usar
- Mayor uniformidad y especificidad definida
- Lotes de producción consistentes que proporcionan resultados de diagnósticos confiables, año tras año
- Eliminación de falsos positivos; sin reacción cruzada
- Puede ser utilizado con el fluido ovárico y el suero, así como con el riñón
- Resultados semi-cuantitativos en 1 hora y 40 minutos

MATERIALES Y REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

Tubos recubiertos con Anticuerpo Monoclonal	Solución de Lavado
Biotina Rotulada con Anticuerpo Monoclonal	Tween 20
Conjugado de HRP	Gotero de 30 ml
Stop Buffer	Solución ABTS
Buffer de Dilución de Muestra	Controles Positivos Fuerte, Bajo
Peróxido de Hidrógeno	Hisopos de algodón
Tubo Cónico de 15 ml	Folleto de Instrucción

FurunKwik-Resumen del Procedimiento

[Página Principal](#)

[Pedido](#)

[Información de
DiagXotics](#)

[Contáctenos](#)



BIOS Chile
INGENIERIA GENETICA S.A.

Líderes en Biotecnología



Reactivos para Diagnóstico de Patógenos en Salmones

BKD ELISA

Ensayo de ELISA para *Renibacterium salmoninarum*.

La enfermedad bacteriana del riñón (BKD, por Bacterial Kidney Disease), es una de las enfermedades infecciosas importantes que afecta la actividad salmonícola. El agente etiológico de esta enfermedad es ***Renibacterium salmoninarum***, inicialmente diagnosticado como el agente de BKD en Escocia y posteriormente en Estados Unidos, Japón y Europa. Dado el gran impacto económico que produce la acción de esta bacteria en la actividad salmonícola, se hace indispensable contar con ensayos que permitan un diagnóstico rápido, seguro y oportuno.

El Test BKD ELISA desarrollado por Bios Chile I.G.S.A. es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección de ***Renibacterium salmoninarum*** en muestras de tejidos y fluidos biológicos de peces. El ensayo incorpora una novedosa tecnología de activación de placas de microELISA consistente en la utilización de un adhesivo biológico para la fijación de anticuerpos específicos para *Renibacterium salmoninarum* a la placa. Esta nueva técnica de activación aumenta la estabilidad de los anticuerpos adheridos a la placa, aumenta la sensibilidad del ensayo de ELISA y disminuye el ruido de fondo. El Test permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras.



CONTACTO CON
ESPECIALISTA

VENTAS



Líderes en Biotecnología



Reactivos para Diagnóstico de Patógenos en Salmones

BKD FLUOROTEST DIRECTO E INDIRECTO

Ensayo de Inmunofluorescencia Directa e Indirecta para *Renibacterium salmoninarum*.

La enfermedad bacteriana del riñón (BKD, por Bacterial Kidney Disease), es una de las enfermedades infecciosas importantes que afecta la actividad salmonicultora. El agente etiológico de esta enfermedad es *Renibacterium salmoninarum*, inicialmente diagnosticado como el agente de BKD en Escocia y posteriormente en Estados Unidos, Japón y Europa. Dado el gran impacto económico que produce la acción de esta bacteria en la actividad salmonicultora, se hace indispensable contar con ensayos que permitan un diagnóstico rápido, seguro y oportuno.

La técnica de Inmunofluorescencia es un ensayo altamente sensible y específico para detectar la presencia de *Renibacterium salmoninarum* en muestras de tejidos. Bios Chile I.G.S.A. ha desarrollado dos variantes de esta técnica: BKD FluoroTest Directo y BKD FluoroTest Indirecto, ambos basados en la utilización de una mezcla de anticuerpos monoclonales altamente específicos para *Renibacterium salmoninarum*. En el test Directo los anticuerpos monoclonales están conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), mientras que en el test Indirecto, se utiliza un anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC. BKD FluoroTest Directo e Indirecto, son ensayos altamente sensibles, específicos y reproducibles para la detección de *Renibacterium salmoninarum*.



CONTACTO CON ESPECIALISTA

VENTAS



Líderes en Biotecnología

Inicio	Quiénes somos	Productos	Proyectos	Noticias y Eventos	Contacto	Links
--------	---------------	-----------	-----------	--------------------	----------	-------



Reactivos para Diagnóstico de Patógenos en Salmones

SRS ELISA

Ensayo de ELISA para *Piscirickettsia salmonis*.

Una de las enfermedades de mayor impacto en la actividad salmonícola desarrollada en Chile, es el Síndrome Rickettsial de Salmonídeos (SRS), cuyo agente etiológico es la *Piscirickettsia salmonis*, bacteria de estricto crecimiento intracelular. Dado el gran impacto económico que produce la acción de esta bacteria en la actividad salmonicultora, se hace indispensable contar con ensayos que permitan un diagnóstico rápido, seguro y oportuno.

El Test SRS ELISA desarrollado por Bios Chile I.G.S.A. es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de tejidos y fluidos biológicos de peces. El ensayo incorpora una nueva tecnología de activación de placas de microELISA consistente en la utilización de un adhesivo biológico para la fijación de anticuerpos específicos para *P. Salmonis* a la placa. Esta nueva técnica de activación aumenta la estabilidad de los anticuerpos adheridos a la placa, aumenta la sensibilidad del ensayo de ELISA y disminuye el ruido de fondo. El Test permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras.



CONTACTO CON ESPECIALISTA

VENTAS

ENCUESTA DE OPINIONES



Líderes en Biotecnología



Reductivos para Diagnóstico
de Patógenos en Salmones

SRS FLUOROTEST DIRECTO E INDIRECTO

Ensayo de Inmunofluorescencia Directa e Indirecta para *Piscirickettsia salmonis*

Una de las enfermedades de mayor impacto en la actividad salmonícola desarrollada en Chile, es el Síndrome Rickettsial de Salmonídeos (SRS), cuyo agente etiológico es la *Piscirickettsia salmonis*, bacteria de estricto crecimiento intracelular. Dado el gran impacto económico que produce la acción de esta bacteria en la actividad salmonicultora, se hace indispensable contar con ensayos que permitan un diagnóstico rápido, seguro y oportuno.

La técnica de Inmunofluorescencia es un ensayo altamente sensible y específico para detectar la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de tejidos. Bios Chile I.G.S.A. ha desarrollado dos variantes de esta técnica: SRS FluoroTest Directo y SRS FluoroTest Indirecto, ambos basados en la utilización de una mezcla de anticuerpos monoclonales altamente específicos para *Piscirickettsia salmonis*. En el test Directo los anticuerpos monoclonales están conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), mientras que en el test Indirecto, se utiliza un anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con FITC. SRS FluoroTest Directo e Indirecto, son ensayos altamente sensibles, específicos y reproducibles para la detección de *Piscirickettsia salmonis*.

CONTACTO CON
ESPECIALISTA

VENTAS

REGISTRADO
COMERCIAL



Líderes en Biotecnología

BIOS Chile	LABORATORIO DE INVESTIGACIONES	COMERCIO	INSTRUMENTACIÓN	REACTIVOS Y REAGENTES	SERVICIOS	FORMACIÓN
------------	--------------------------------	----------	-----------------	-----------------------	-----------	-----------



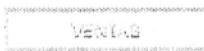
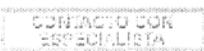
Reactivos para Diagnóstico de Patógenos en Salmones

IPNV GENOTEST I

Ensayo de ELISA-PCR para la detección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)

El virus responsable de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) pertenece a la familia de los Birnaviridae y afecta tanto al Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) como a las Truchas. Dado el gran impacto económico que produce la infección salmonídeos por este virus, se hace indispensable contar con ensayos sensitivos específicos, que permitan un diagnóstico rápido, seguro y oportuno. Bios Chile I.G.S.A. ha desarrollado el ensayo IPNV-GenoTest I, que se basa en la amplificación del genoma viral por RT-PCR y la posterior detección del producto de amplificación mediante un ELISA de captura.

El Test incluye los reactivos para la extracción del genoma viral de muestras de tejidos y fluidos biológicos de peces, tales como plasma, células sanguíneas, líquido celómico y líquido espermático. En una primera etapa se sintetiza el cDNA correspondiente al RNA genómico viral, luego el cDNA se amplifica mediante PCR. El producto amplificado se denatura para ser capturado en la placa de ELISA mediante hibridación específica con un oligonucleótido complementario que ha sido previamente inmovilizado en la placa. Finalmente el producto amplificado se detecta mediante un ensayo de ELISA.





Líderes en Biotecnología

Inicio	Quiénes somos	Productos	Referencias y testimonios	Contacto	Noticias
--------	---------------	-----------	---------------------------	----------	----------



Reactivos para Diagnóstico de Patógenos en Salmones

IPNV FLUOROTEST INDIRECTO

Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta para el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV)

El virus responsable de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) pertenece familia de los Birnaviridae y afecta tanto al Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cc las Truchas. Dado el gran impacto económico que produce la infección salmonídeos por este virus, se hace indispensable contar con ensayos sensit específicos, que permitan un diagnóstico rápido, seguro y oportuno. La técnica Inmunofluorescencia es un ensayo altamente sensible y específico para la dete de patógenos en muestras de tejidos de peces.

Bios Chile I.G.S.A. ha desarrollado el ensayo IPNV FluoroTest Indirecto, basado utilización de una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos para el virus del serotipo Sp y VR-299.

Estos anticuerpos reaccionan con antígenos específicos del virus y la reacción detecta con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC. La presencia virus se visualiza como una intensa fluorescencia verde y puntiforme en el citoplasma de las células infectadas.



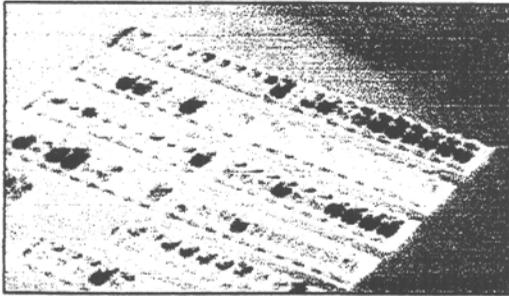
CONTACTO CON ESPECIALISTA

VENTAS

CONTACTO CON ESPECIALISTA

OUR PRODUCTS

API, bacterial identification



The API identification products comprise strips, generally containing 20 miniature biochemical tests, and databases. The API range currently offers 16 identification products covering almost all bacterial groups and over 550 different species. This range is updated regularly to allow identification of certain bacteria which are becoming increasingly important : *Corynebacterium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Neisseria*, etc.

Innovation and know how

The concept of the API strip was a real revolution in bacteriology when it was created in 1970 :

- miniaturization and standardization of conventional techniques which were extremely difficult to perform and interpret,
- association of a strip of biochemical tests and a database.

With API, identification became easy, quick and safe. API's innovation also covered the development of numerical identification, a calculation method which made it possible to develop software for quicker and more precise identification.



Today, the experience with API is the base for bioMérieux's bacterial identification know how : over 1000 different biochemical tests performed regularly, in-depth knowledge of bacterial metabolisms and perfect control of manufacturing techniques.

The world wide reference for identification

Adopted by bacteriologists throughout the world for its ease of use and its performance, the API range quickly became the world wide reference for identification.

- over 1500 scientific publications refer to API products
- API systems are used as reference techniques to assess other identification products
- new species of bacteria have been detected with API products, such as *Staphylococcus lugdunensis* for example.

SECCION 2

MANUAL DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE MOLUSCOS

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	PROCEDIMIENTOS GENERALES	2
	1.- Toma de Muestras	2
	• Muestreo por zonas	3
	• Período de muestreo y frecuencias	3
	• Tamaño de la muestra	4
	• Transporte de las Muestras	4
	2.- Diagnóstico	4
	2.1.- Análisis Macroscópico	5
	2.2.- Métodos de Diagnóstico	6
	Histología	6
	• Fijación del tejido	6
	• Deshidratación, Impregnación e Inclusión de las Muestras	7
	• Preparación de las Secciones	8
	• Tinción y Montaje en los portaobjetos	8
	Microscopia Electrónica	9
	• Fijación de los Tejidos	9
	• Deshidratación, Impregnación y Inclusión de las Muestras	10
	• Preparación de los cortes y la Contratinción	10
	• Procedimientos para detección de virus en larvas:	11
	Bioquímicos	12
	Procedimientos inmunológicos	16
	Moleculares	16

III.-PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS	17
A.-OSTRAS	17
1.-BONAMIOSIS	17
<i>Bonamia ostreae</i>	17
<i>Bonamia sp. (Bonamiosis de las Ostras de Nueva Zelandia)</i>	18
Métodos de diagnóstico	19
2.-HAPLOSPORIDIOSIS	21
<i>Haplosporidium nelsoni (MSX)</i>	21
<i>Haplosporidium costale</i>	22
Métodos de Diagnóstico	23
3.-MARTEILIOSIS	27
Marteiliosis	27
<i>Marteilia sydneyi (QX)</i>	28
Métodos de Diagnóstico	29
4.-MIKROCYTOSIS	31
<i>Mikrocytos mackini</i>	31
<i>Mikrocytos roughleyi</i>	32
Métodos de Diagnóstico	32
5.-PERKINSOSIS	35
<i>Perkinsus marinus (Enfermedad“Dermo”)</i>	35
Métodos de Diagnóstico	37
6.-POLIQUETOS PERFORADORES DE LAS VALVAS (<i>Polydora</i>)	39
7.-VIBRIOSIS LARVAL Y JUVENIL DE LAS OSTRAS (<i>Vibrio sp.</i>)	40
Técnicas de Diagnóstico	40
8.- NEOPLASIA HEMOCÍTICA DE LAS OSTRAS	41
Técnicas de Diagnóstico	41
B.-MITILIDOS	43
1.-POLIQUETOS PERFORADORES DE LA VALVA	43
Técnicas de Diagnóstico	43

2.-NEOPLASIA HEMOCITICA DE LOS MITILIDOS	45
Técnicas de Diagnóstico	46
C.-PECTINIDOS	47
<i>1.-Vibrio spp. (Vibriosis larval)</i>	47
Técnicas de Diagnóstico	47
Métodos de Control	48
2.-POLIQUETOS PERFORADORES DE LA VALVA	49
Técnicas de Diagnóstico	50
Métodos de Control	50
3.-TRICODINAS DE LA BRANQUIA	51
Técnicas de Diagnóstico	51
Métodos de Control	51
 IV.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	 52

I. INTRODUCCION

El conocimiento sobre las enfermedades de moluscos se encuentra menos desarrollado que en los peces, es así como son escasos los libros sobre procedimientos generales de diagnóstico, prevención y tratamiento. En la actualidad, se dispone de los manuales de diagnóstico de la OIE (versión 2000) y del "Blue Book" (Thoesen, 1994 y páginas actualizadas, 2000). Esta obra, según Elston (1994), marca la partida en un área poco estudiada de la medicina animal, como es la de moluscos, cuya biología es substancialmente diferente a la de los peces.

Dentro de las técnicas de diagnóstico, el área concerniente a los virus es quizás una de las que muestra menor avance, debido al escaso desarrollo en los cultivos celulares y de tejidos de estos organismos, motivo por el cual la detección de dichos agentes se realiza mediante el uso de microscopía electrónica.

Los invertebrados no producen anticuerpos tal como se conoce en peces por lo que los procedimientos inmunológicos, útiles en detección precoz serían difíciles de llevar a cabo. Es así como en la mayoría de los casos no existen métodos para detectar infecciones subclínicas.

Las herramientas de diagnóstico más modernas no están todavía disponibles para ser aplicadas al diagnóstico práctico de las enfermedades de moluscos, por esto la mayoría de los procedimientos en este sentido se basan en el análisis histológico, el cual es un proceso relativamente lento si se aplica a un campo de la producción en que muchas veces se requieren respuestas rápidas para actuar en forma oportuna y acertada.

En la primera parte del presente manual se presentan los procedimientos generales de toma y mantención de las muestras y en la segunda se incluyen los protocolos de las técnicas de diagnóstico recomendadas por la OIE y otros manuales de diagnóstico para enfermedades específicas de los moluscos de interés.

La presentación de las enfermedades seguida por sus protocolos de diagnóstico se ha ordenado de acuerdo a la categorización de enfermedades de moluscos realizados en el objetivo 4.1. De esta forma, se comienza con la descripción de las enfermedades correspondientes a la categoría 1, que no están presentes en el país pero que son de importancia internacional. A continuación y en los casos que corresponde, se mencionan las enfermedades agrupadas en la categoría 2 que tienen importancia nacional por haber sido diagnosticadas en el país.

II. PROCEDIMIENTOS GENERALES

En el Manual de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos, OIE 2000, se distinguen 3 niveles de procedimientos de análisis:

1.- Procedimientos rutinarios para vigilancia, en los cuales se utilizan principalmente las técnicas histológicas para el análisis.

2.- Procedimientos especiales cuando se presentan índices anormales de mortalidad. En este caso se utilizan varios métodos de diagnóstico, en forma adicional a las técnicas histológicas.

3.- Procedimientos específicos para identificar patógenos descubiertos en los procedimientos previos. Se utilizan técnicas moleculares o de microscopía electrónica.

Frente a un cuadro anormal, se recomienda utilizar como primer paso la histología, como procedimiento previo o adicional a otros exámenes, ya que proporciona una gran cantidad de datos. Esto es particularmente importante porque el examen macroscópico, generalmente no proporciona signos patognónicos. Por otro lado el índice de mortalidad se puede deber a distintos patógenos o a problemas fisiológicos, como por ejemplo, pérdida de condición post desove, lo que solamente se determina utilizando histología.

1.-Toma de Muestras

- **Muestreo por zonas**

En el Manual para Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos (OIE 2000), se indica que para maximizar las probabilidades de detectar patógenos, se deben seleccionar diferentes sitios de muestreo en zonas definidas. Además, se deben considerar los parámetros que tienen un efecto en el desarrollo del agente infeccioso, tales como la densidad del stock, el flujo de agua y el ciclo de desarrollo de los moluscos. Se recomienda, además, seleccionar 3 puntos de muestreo de una población, por zona geográfica. La cantidad de puntos de muestreo deberá aumentar en aquellas zonas muy extensas, en las cuales existen diferentes áreas de cultivo de la especie susceptible. Por otra parte, hay que considerar la toma de muestras desde los bancos naturales de moluscos. Las muestras tomadas, debieran cubrir el rango de tamaño de los distintos grupos y se deben mostrar también, moluscos que muestren anomalías, (crecimientos

anormales, valvas abiertas, índices anormales de mortalidad), para hacer así más representativa la muestra.

- **Período de muestreo y frecuencias**

La periodicidad y frecuencia de los muestreos debe estar determinada por el ciclo de infección del patógeno y períodos de mayor susceptibilidad a las infecciones, ya que la intensidad de infección de los patógenos está asociada a la pérdida de condición del huésped después del desove. Se recomienda tomar las muestras después que éste finalice.

En los períodos de muestreo se debe tomar en cuenta el traslado de los moluscos, lo cual generalmente ocurre en primavera y otoño. Se deben tomar muestras, al menos, dos veces al año.

- **Tamaño de la muestra**

Durante el período inicial de muestreo que precede al otorgamiento de país o zona libre (según Código OIE, 2000), se debe extraer de cada sitio de muestreo un número de ejemplares no menor de 150 o la cantidad suficiente para asegurar la detección de un portador de patógenos con un nivel de confianza del 95%, suficiente para asumir la prevalencia del patógeno. Este porcentaje se deberá mantener en los años siguientes (dos años mínimo), debido a los problemas que existen para conservar las zonas marinas.

Si los bivalvos son trasladados desde bancos naturales a un establecimiento de cultivo o a otro banco natural en zonas diferentes, se deberá tomar muestras de una gran cantidad de bivalvos debido a la baja frecuencia de los parásitos en bancos naturales, un ejemplo es el de Australia occidental, donde se ha detectado en bancos aislados la presencia de los patógenos *Marteilia sidneyi*, *M. lengehi* y *Perkinsus sp*, en prevalencias de 0.1%, estos bancos no habían sido intervenidos por el hombre. Sin embargo, la probabilidad de detección de la infección puede aumentar manteniendo los bivalvos en cuarentena por períodos prolongados y someténdolos a estrés (sobredensidad, manipulación, cambios de temperatura y salinidad, etc.).

Los miembros de las especies de Arcidae (*Ara*, *Barbatia*), Malleidae (*Malleus*), Isognomonidae, Chamidae (*Chama*) y Tridacnidae (*Tridacna*) toleran altas frecuencias de infección

de *Perkinsus* y son buenos indicadores de su presencia . Si se detecta en las especies mencionadas se podría asumir que *Perkinsus* está presente en las ostras u otros bivalvos

- **Transporte de las Muestras**

Las muestras de los moluscos deberán ser enviadas a los laboratorios de diagnóstico aprobados, dentro de las veinticuatro horas siguientes al muestreo, embalados de tal forma de mantenerlos vivos. Se debe rotular cada una de las muestras, indicando claramente el lugar donde se tomó la muestra, origen e historial de la producción (si existe).

2.-Diagnóstico

- **Análisis de Stocks ante la presencia de mortalidades anormales**

Este tipo de mortalidad corresponde a una mortalidad repentina considerable (más del 15% del stock) que se presenta durante un corto periodo entre dos observaciones (15 días). En los hatcheries, ésta se produce por una falla en las producciones sucesivas de larvas provenientes de diferentes reproductores.

Siempre que se produzca este tipo de muerte en los stocks de los moluscos bivalvos, se deberá realizar una investigación urgente para determinar la etiología.

La muestra debe estar conformada por 100-150 moluscos y su análisis se debe realizar de acuerdo al procedimiento definido para el análisis histológico y los otros análisis, como por ej: microscopía electrónica.

Por otra parte, y siempre que estén disponibles, se deberán fijar moluscos de control o no infectados, para realizar comparaciones histológicas con los tejidos anormales. Sin importar el fijador utilizado, es muy importante extraer la concha del bivalvo para permitir el fácil ingreso del fijador.

2.1.-Análisis Macroscópico

Abrir los moluscos cuidadosamente para no dañar los tejidos blandos. Registrar cualquier anomalía o lesión de los tejidos, así como también cualquier deformación de la concha, organismos perforadores de la valva y los parásitos que habitan el manto.

- **Procedimientos para examen de Larvas:**

Las larvas y post-larvas deben ser examinadas vivas en forma visual para registrar la presencia de signos de enfermedad. Los individuos que presenten signos aparentes de enfermedad deben ser seleccionados y colocados en una placa Petri conteniendo agua de mar y examinadas bajo microscopio estereoscópico. Cuando sea necesario las larvas pueden ser tranquilizadas o aletargadas mediante hipotermia.

Se preparan montajes húmedos y se observan en microscopio para la detección de bacterias, hongos o protozoos.

- **Procedimientos para examen de Juveniles y Adultos:**

Los procedimientos para el examen externo son generalmente similares para todos los Moluscos.

Los individuos seleccionados deben ser abiertos cuidadosamente, cortando primero el músculo abductor, teniendo la precaución de no dañar los tejidos, en particular el manto, branquias, corazón y glándula digestiva. Se deben registrar las anomalías y lesiones de los tejidos como también las deformidades de la concha, organismos que la perforan y parásitos que habitan en el manto. Se examinan bajo microscopio estereoscópico para detectar anomalías o parásitos en los órganos. Se preparan montajes húmedos de los diversos tejidos y se observan en microscopio óptico.

2.2.-Métodos de Diagnóstico

Histología

Esta técnica se utiliza para analizar la estructura de las células y tejidos bajo microscopio. Para la preparación de los tejidos existen diferentes pasos, incluyendo la fijación del tejido, deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras, preparación de los cortes histológicos, tinción y montaje en portaobjetos.

Las condiciones óptimas para la toma de muestras de tejidos la proporcionan los animales moribundos o aquellos que acaban de morir (pocos minutos). Tomar una sección estándar a través de la glándula digestiva e incluir, siempre que sea posible, branquias, manto y palpos. Otra alternativa para los especímenes de gran tamaño es tomar varias secciones para así incluir los tejidos importantes.

- **Fijación de tejidos**

La función de los fijadores es mantener la morfología de los tejidos, lo más parecida la morfología *in vivo* posible y, además, evitar la necrosis. Los fijadores que se recomiendan para el análisis de los moluscos marinos de mayor tamaño son la solución de Davidson y la solución de Carson. Para los especímenes más pequeños se recomienda el uso de los fijadores GHF u otros de glutaraldehído, ya que son compatibles con el uso del microscopio electrónico. Para asegurar una buena fijación, la relación fijador/volumen de tejido debe ser 10:1.

Solución de Davidson

Agua de Mar	1200 ml
Alcohol al 95%	1200 ml
Formaldehído al 38%	300 ml
Glicerol	400 ml
Acido acético glacial 10%	(agregar extemporáneamente)

Solución de Carson

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	23,8 g.
NaOH	5,2 g.
Agua destilada	900 ml
Formaldehído al 40%	100 ml
Ajustar el pH a 7,2 - 7,4	

En el caso de que ninguno de estos fijadores esté disponible, utilizar formalina al 10 % mezclada con agua de mar. La solución de Davidson es la mejor alternativa para preservar la

estructura de los tejidos, debido a que contiene agua de mar. Además, es posible realizar tinción en las secciones de los tejidos fijados con la solución Davidson, utilizando diferentes métodos histoquímicos, así como también, hibridación *in situ* con exámenes de ADN. Para estos propósitos es importante evitar la sobrefijación (más de 24 horas).

Es muy probable que la solución Carson no sea tan útil como la de Davidson cuando se practiquen análisis histológicos. Sin embargo, esta solución permite preservar adecuadamente la ultraestructura y se puede utilizar para preservar las muestras para su posterior análisis en un microscopio electrónico. Debido a que el microscopio electrónico representa un accesorio muy valioso en el diagnóstico y confirmación de las infecciones de los moluscos, se debe considerar la fijación de algunas muestras, en especial la más pequeñas, utilizando un glutaraldehído. De otra forma, se podrá realizar una nueva fijación (de los materiales fijados con la solución Carson), en aquellas muestras que se compruebe la presencia de patógenos. Este procedimiento sirve para asegurar la fijación de todos los tejidos/órganos en ambos fijadores.

- **Deshidratación, Impregnación e Inclusión de las Muestras**

Existen diferentes pasos para la inclusión las muestras en parafina, durante los cuales se reemplaza el agua que contienen los tejidos, primero por alcohol y luego por un xileno o cualquier solución equivalente de menor toxicidad y, finalmente, por parafina.

Luego de fijar las muestras con solución Carson o Davidson, transferirlas a alcoholes graduados (70 – 95 % [v/v] antes de lograr su deshidratación final en etanol absoluto, eliminar el alcohol presente en los tejidos, sumergiéndolos en xileno. Después, impregnar los tejidos con parafina, la cual a una temperatura de 60° C es soluble al xileno. Todos estos pasos se pueden llevar a cabo en forma automatizada.

Al dejar los tejidos enfriarse en moldes con parafina sobre una superficie fría, se producirán bloques. El enfriamiento e hidratación son esenciales para realizar el corte de las secciones.

- **Preparación de las Secciones**

Luego que los bloques se hayan enfriado en una placa fría (permitiendo así la solidificación de la parafina), cortar secciones histológicas de 2 – 3 μm , utilizando un micrótomo. Recuperar las secciones en un portaobjeto, dejar filtrar y secar a una temperatura de 60° C durante toda la noche. Esta temperatura permite eliminar el exceso de humedad presente en las muestras y, de esta forma, permitir que las secciones se adhieran a los portaobjetos.

- **Tinción y Montaje en los portaobjetos**

Antes de proceder a la tinción, se debe eliminar la parafina de las secciones cortadas, sumergiéndolas por 10 o 20 minutos en xileno u otra solución aclaradora (menos tóxica). Este proceso se repite una sola vez y después se elimina el solvente sumergiéndolas en dos baños sucesivos de etanol absoluto, cada sección por un periodo de 10 minutos y, luego, rehidratar sumergiéndolas en agua potable por un periodo de 10 minutos. Después, realizar tinciones histoquímicas diferentes.

Cuando se utiliza tinción con hematoxilina-eosina o equivalente, las estructuras nucleares y basófilas se tornan de un color azul o púrpura oscuro, el retículo endoplásmico se torna azul y el citoplasma se torna gris. Con la eosina de tinción de ácidos, el resto de las estructuras se tornan rosadas. Esta es una técnica fácil y reproducible y, a pesar que sólo permite lograr una diferenciación limitada de las estructuras celulares, permite detectar cualquier anomalía en las estructuras celulares y de los tejidos. Existen otras técnicas que permiten, según las necesidades, demostrar la presencia de características y estructuras particulares (por ej. Tricromo para tejidos conectivos y gránulos citoplásmicos).

- **Microscopia Electrónica**

Realizar la fijación para el microscopio electrónico justo antes de la fijación para la histología. Para esto sólo servirán las muestras extraídas rápidamente de animales vivos. La preparación de las muestras para microscopía electrónica se realiza de la siguiente forma: fijación del tejido, descalcificación de las muestras (siempre que sea necesario), deshidratación, impregnación e inclusión de las muestras y, además, preparación y tinción de los cortes de las secciones.

- **Fijación de los Tejidos**

Es muy importante realizar correctamente la fijación de los tejidos que se analizan bajo microscopio electrónico, para así evitar daños mayores en la ultraestructura. Realizar cortes en los especímenes de tal forma, que el ancho no exceda los 3-4 mm, ya que así se logra que las soluciones penetren rápidamente en las muestras.

El proceso de fijación de las muestras directamente en glutaraldehído al 3 % por un periodo de una hora. Si la fijación se realiza por un periodo más largo, es probable que se produzcan artefactos membranosos. Lavar tres veces las muestras en un tampón, luego, fijar en un ácido ósmico al 1 % y volver lavar dos veces en un tampón. Existen diferentes fórmulas de fijadores glutaraldehídos que también funcionan.

Para evitar daños mayores en la ultraestructura, tratar las muestras con soluciones que tengan una osmolaridad lo más parecida a la de los tejidos. De esta forma, los tejidos de los moluscos se tratan con soluciones que presenten una osmolaridad cercana a los 1000 mOsm. Ajustar la osmolaridad de las soluciones a NaCl. Debido a que los tejidos de las ostras son casi iso-osmóticos con agua de mar, es posible preparar el glutaraldehído con agua de mar filtrada de 0,22 μm y, luego, utilizar esa agua de mar filtrada para el resto de los lavados.

Si se fijó y almacenó las muestras en solución de Carson, lavar varias veces en un baño de tampón antes de realizar la fijación con el glutaraldehído al 3 %.

- **Deshidratación, Impregnación e Inclusión de las Muestras**

Deshidratar las muestras en baños consecutivos realizados con etanol: una vez con etanol al 70 %, dos veces con etanol al 95 % y tres veces con etanol absoluto. Completar la deshidratación con dos baños de óxido de propileno, el cual permite la posterior impregnación con Epon y otro tipo de resina.

Impregnar las muestras en forma progresiva. Luego del primer baño realizado con una mezcla de óxido de propileno-Epon (50/50), colocar las muestras en un baño de Epon. Mientras más largo sea el periodo de incubación, mayor será la impregnación de los tejidos.

Colocar las muestras en moldes con resina Epon para llevar a cabo la Inclusión. Colocar en cada bloque una etiqueta de identificación de la muestra y luego colocarlos a una temperatura de 60° C (en la cual se polimeriza la resina Epon) por un periodo de 48 horas.

- **Preparación de los cortes y la contratinción**

Cortar los bloques de un tamaño apropiado utilizando una hoja de afeitar, luego, cortar las secciones utilizando un ultramicrotomo. Cortar secciones más delgadas (0,5-1 μm) y colocarlas en portaobjetos. Estas servirán para controlar la calidad de las muestras con un microscopio de luz y, así, detectar las áreas interesantes en las secciones.

Realizar la tinción de las secciones más delgadas a una temperatura de 90-100°C, utilizando una solución azul toluidina al 1%. Luego de secar, colocar los cubreobjetos sobre los portaobjetos, agregando una gota de resina sintética. Observar bajo microscopio de luz.

Colocar las secciones ultra delgadas, de 80-100 nm, sobre una grilla de cobre para su análisis de microscopía electrónica. Utilizar acetato de uranilo y citrato de plomo para la tinción de los cortes de las secciones ultra delgadas.

Los siguientes procedimientos de examen (larvas, juveniles y adultos) formar parte de la recopilación de antecedentes para el desarrollo del proyecto FIP 95-32 “*Desarrollo de un programa de detección y tratamiento de enfermedades de moluscos cultivados en Chile*”

- **Procedimientos para detección de virus en larvas:**

Debido a que no se encuentran disponibles en el comercio las líneas celulares de moluscos, el diagnóstico viral de las larvas se realiza mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET), siguiendo el procedimiento empleado por Hine (1992).

- a) Fijar las larvas en glutaraldehído al 2,5% en agua de mar filtrada (0,22 μm) por un período de una a dos horas.
- b) Lavar 2 veces en agua de mar filtrada para eliminar el fijador
- c) Centrifugar para formar un pellet y eliminar el agua de mar sobrenadante
- d) Colocar el pellet en un fluido de agar al 2%
- e) Transferir el pellet en agar a un portaobjeto y cortar en pequeños trozos que se ponen en tampón Cacodilato 0,1 M
- f) Realizar un post-fijado en Tetróxido de Osmio al 1% en buffer Cacodilato 0.1 M por una hora
- g) Descalcificar en EDTA al 5% en Cacodilato 0.1 M por 30 a 45 minutos
- h) Deshidratar en una serie de Etanol (50 a 100%)
- i) Lavar 2 veces por 10 minutos en Oxido de Propileno
- j) Infiltrar durante una hora en Oxido de Propileno/Resina Epóxica (Araldite) 50/50
- k) Realizar inclusiones en resina al 100% toda la noche y dejar secar por 48 horas a 60°C
- l) Cortar secciones ultrafinas y teñir con Acetato de Uranilo en Etanol 50% por 10 minutos y con Citrato de Plomo en agua destilada hervida por 5 minutos
- m) Analizar en microscopio electrónico de transmisión (MET)

- **Bioquímicos**

Los patógenos bacterianos son una de las principales causas de mortalidades en los cultivos de moluscos y el impacto en la producción en el país corresponde a la presencia de especies de Vibrios que causan altas mortalidades en los cultivos larvales de Pectinidos. Los trabajos de Riquelme et al. 1995, informan que las mortalidades asociadas a estos patógenos alcanzan hasta un 96,6%. Asociados a las especies de *Vibrio*, ha sido reportada la presencia de *Pseudomonas* y *Moraxella* en larvas, pero con un menor impacto en la sobrevivencia. Las especies de *Vibrio* que han sido identificadas corresponden a *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus* y *Vibrio sp.*. La caracterización bioquímica de estas especies se detalla en tabla I

Los procedimientos para el aislamiento de las bacterias por etapas de desarrollo (juveniles y larvas), se describen a continuación:

Juveniles y Adultos:

Lavar y desinfectar los individuos seleccionados para este análisis, sumergiendo las partes blandas en solución desinfectante, o bien en agua de mar estéril. Luego, colocar en una superficie limpia y tomar los inóculos para siembra con un asa o tórula estéril en un medio selectivo para bacterias marinas. Utilizar el medio Thiosulphato Citrato Bile Salts Sucrosa (TCBS) para identificar *Vibrio*, algunos autores recomiendan suplementar el medio con un 1% de NaCl (w/v), (Elston, 1990). Incubar las placas con las siembras a una temperatura similar a la del agua de la cual se tomaron los individuos. Además, es posible utilizar un Agar de Soja Tríplica (TSA) suplementado con 2% de NaCl.

Individualizar y aislar las colonias que crecen para su posterior identificación, a través de pruebas bioquímicas.

Larvas:

En el caso de las larvas se recomienda sembrar en las placas Petri preparadas con medios de crecimiento TCBS o TSA más NaCl, para así detectar fuentes de contaminación microbiana desde tres orígenes:

- Sistema de agua de mar
- Reproductores
- Fuentes de microalgas.

Diluir las muestras para proveer colonias contables en la placa. El grado de dilución dependerá de las condiciones locales, sin embargo, una dilución inicial va desde la no diluída hasta 0,0001 en agua de mar estéril o solución salina.

En foma adicional, tomar muestras de las larvas en cultivo, separando las larvas de fondo de las de la columna de agua; utilizar una jeringa de 1,0 ml estéril, permitiendo que las larvas sedimenten hacia al extremo de la jeringa y, luego, colocar los 0,5 ml del extremo donde están las larvas en un tubo con 2,0 ml de agua de mar estéril o solución salina al 1 o 3% (w/v). Colocar la muestra en un equipo que permita triturar las larvas, como por ejemplo un Tissue Teator u otro similar (Ten-Broeck tissue grinder). Luego de homogeneizar las larvas, sembrar cuantitativamente como se indicó anteriormente, (Elston, 1990).

Existen otros medios de crecimiento más específicos que pueden complementar la información de las bacterias contaminantes de las larvas y sistemas, como podría ser el caso del medio para las bacterias deslizantes o Myxobacterias marinas, las cuales necesitan pocos nutrientes como es el caso del Agar Citofaga de Agua de mar (SWCA), el que se puede utilizar en conjunto con los otros medios (TCBS o TSA), en especial cuando se sospeche la presencia de la "Enfermedad del Ligamento de los Moluscos".

Se debe cuantificar, caracterizar e identificar las colonias que hayan crecido, utilizando procedimientos bioquímicos estándares.

Los procedimientos para confirmar la identidad de las bacterias caracterizadas mediante pruebas bioquímicas contemplan las pruebas inmunológicas para aquellas bacterias donde existan anticuerpos disponibles, como por ejemplo, algunas especies de *Vibrio*.

Elston (1991), describe un procedimiento para el diagnóstico rápido de *Vibrio* en larvas, el cual contempla un procedimiento de descalcificación histológica y cuando éste se haya completado, sugiere neutralizar la solución utilizada por medio de tampón fosfato y, finalmente, reemplazar el tampón con solución salina 1,5% (w/v). Luego, realizar la inclusión de las larvas en medio "cryostat cutting" y dejar enfriar rápidamente a -70° C. Cortar secciones de 4 μ m y realizar la tinción con el conjugado del antisuero para luego analizar las secciones en microscopio de epifluorescencia y registrar las bacterias positivas.

Tabla I: Caracterización bioquímica de las cepas de *Vibrio* aisladas por Riquelme et al. 1995 en larvas de *Argopecten purpuratus* cultivadas en Chile

Características	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio spp.</i>
Gram	-	-	-
Motilidad	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Catalasa	+		
Voges-Proskauer	-		
Producción Indol	+		
Utilización Citrato	-		
Producción H ₂ S	-		
O/F (Glucosa)	F	F	F
Gas desde Glucosa	-	-	-
VP	+	+	-
Crecimiento 5° C	-		
Crecimiento 15° C	+		
Crecimiento 25° C	+		
Crecimiento 37° C	-		
Crecimiento 42° C	-	+	-
Crecimiento 0% NaCl	-	-	-
Crecimiento 3% NaCl	+	+	+
Crecimiento 5% NaCl	+		-
Crecimiento 8% NaCl	-		
Crecimiento 10% NaCl	-	+	
Crecimiento TCBS	+ amarillo	+	+
Arginina	+	-	+/-
Lysina	-	+	+/-
Ornithina	-	+	-
Lipasa (Tween 80)	+	+	+
ONPG	+		
Ureasa	-		
Gelatinasa	+	+	+/-
Amilasa	+	+	+/-
Hemolisis (profundidad)	+		
Producción Acido desde Glucosa	+		
Manosa	+		
Galactosa	+		
Fructosa	+		
Sucrosa	+	+	-

Ramnosa	-		
Arabinosa	-	-	-
Amigdalina	+		
Melibiosa	-		
Manitol	+		
Inositol	-		
Sorbitol	-		
Sensibilidad/resistencia a:0/129	S	-	+
Novobiocina	R		
Ampicilina	R		
Cloramfenicol	I		
Tetraciclina	R		
Oxitetraciclina	R		
Estreptomicina	I		
Eritromicina	R		
Kanamicina	I		
Acido Oxolínico	R		
Furazolidona	S		
Trimetropim- sulfametoxazole	R		

Fuente: adaptado de Riquelme et al 1995

F: Cepa fermentativa R. Resistente S: Sensible I. Intermedio

- **Procedimientos inmunológicos**

Debido a la carencia de la respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas en los invertebrados, el diagnóstico inmunológico de las infecciones depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos representan el componente más importante en cualquier inmunoensayo. La disponibilidad de antígenos para la inmunización depende de la posibilidad de aislar y purificar los patógenos, lo que resulta problemático en los moluscos, ya que la mayoría de los patógenos son protozoos intracelulares, Rickettsias y virus (Mialhe et al, 1992). A pesar de ello, algunos autores han descrito protocolos para la preparación de anticuerpos altamente específicos, es el caso de los *Baculovirus*, *Bonamia ostreae* y organismos tipo Rickettsiales.

Las experiencias realizadas para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales han permitido probar los ensayos de Fluorescencia y ELISA para los patógenos *Bonamia ostreae* de *Ostrea edulis*, Rickettsia branquial de *Pecten maximus*, *Lymphocystivirus* asociado con peces y *Vibrio P1*, el agente de los anillos café en la almeja *Tapes philippinarum*. Sin embargo, aún no existe disponibilidad comercial de los anticuerpos

- **Moleculares**

Mialhe et al, (1992) señala que debido a la falta de información genética de los patógenos de los moluscos y camarones, la mayoría de las pruebas de ácidos nucleicos preparadas consisten en fragmentos de compuestos genómicos de ADN clonados de secuencias específicas para ciertas especies o cepas, pero la condición esencial sigue siendo la obtención de patógenos aislados y purificados. Por lo tanto, las experiencias que se han realizado se reducen a trabajos de investigación con los patógenos que se han purificado y que son los mencionados en el punto anterior. Aún así se necesita un mayor conocimiento de la biología molecular de los patógenos para lograr un mayor avance en este tipo de técnicas de diagnóstico.

Recientemente se han publicado trabajos relacionados con métodos moleculares para la detección de agentes específicos como es el caso del trabajo de Pernas et al. 2001 quienes desarrollaron el “*nested*” PCR para el diagnóstico de *Marteilia refringens*

III.-PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS

La información que se entrega a continuación fue estructurada tomando en cuenta la especie afectada y al grupo de afiliación taxonómica del agente causal de la enfermedad. Se ha seguido la secuencia utilizada en el Manual de la OIE para describir cada una de las enfermedades. Al final de cada descripción se incluye la técnica de diagnóstico recomendada por la OIE, para los casos que corresponda y en los casos de enfermedades no mencionadas por la OIE, se ha utilizado información a partir de las publicaciones científicas.

A.-OSTRAS

BONAMIOSIS

En el Manual de la OIE (2000) Bonamiosis se refiere solamente a enfermedades en ostras causadas por *Bonamia ostreae* en el Hemisferio Norte y *Bonamia* sp. en el Hemisferio Sur. Si se detecta *Bonamia spp.* fuera del rango conocido se deberá utilizar la microscopía electrónica y las pruebas moleculares, si están disponibles, para identificar y distinguir el organismo detectado de otras especies de microcélulas. (ejemplo. *Mikrocytos mackini* y *M. roughlery*). La presencia de estos patógenos en algún bivalvo debe considerarse como potencialmente grave y se deberá consultar a un laboratorio de Referencia de la OIE

Bonamia ostreae

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la Enfermedad de la microcélula, Bonamiasis, Enfermedad Hemocítica de la ostra plana, parasitosis hemocítica.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Bonamia ostreae*.

- ◆ Distribución geográfica: Europa, costa desde España a Dinamarca, Irlanda y Gran Bretaña (excluyendo Escocia) y costa oeste (California y Washington) y este (Maine) de Estados Unidos.
- ◆ Especies huésped: *Ostrea edulis* y experimentalmente en *Ostrea angasi* y *Tiostrea chilensis*, (= *Tiostrea lutaria*). *Crassostrea gigas* no ha podido ser infectada experimentalmente. Se ha encontrado la presencia de microcelulas en las células de los tejidos conectivos vesiculares de *Ostrea conchaphila* (= *Ostrea lurida*) de Oregon, USA aparentando ser *B. ostreae* (Farley et al. 1988). Sin embargo, Elston (1990) indicó que aunque experimentos sugieren que *O. conchaphila* puede contraer la enfermedad, no se ha demostrado su presencia en forma positiva.
- ◆ Impacto en el Huésped
Aunque algunas ostras infectadas parecen normales, otras pueden tener decoloraciones amarillas y/o lesiones graves (ejemplo, úlceras perforadas en las branquias y en el manto). La patología aparece relacionada con destrucción de hemocito y diapedesis, debido a la proliferación de *B. ostreae*. Las lesiones ocurren en el tejido conectivo de las branquias, manto y glándula digestiva. Aunque algunas ostras planas mueren con infecciones leves, otras sucumben a graves infecciones. Las ostras que presentan infecciones graves tienden a estar en peores condiciones que las no infectadas. En un estudio, se detectó que la presencia de la *Bonamia* estaba más relacionada al tamaño que a la edad de *O. edulis* y el nivel de infección fue estadísticamente independiente a la etapa de desarrollo de la gónada (Cáceres-Martínez et al. 1995).

Bonamia sp. (Bonamiasis de las Ostras de Nueva Zelanda)

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la Enfermedad de la microcélula, Bonamiasis, Enfermedad hemocítica de las ostras de dragado.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Bonamia sp.* actualmente considerada diferente a la *Bonamia ostreae*.
- ◆ Distribución geográfica: Foveaux Strait y otros lugares alrededor de South Island, Nueva Zelanda; Victoria y Tasmania, Australia.
- ◆ Especies huésped: *Tiostrea chilensis* (= *Tiostrea lutaria*), *Ostrea angasi*.

◆ Impacto en el Huésped

Al igual que *B. ostreae*, este protozoo intrahemocítico rápidamente se vuelve sistémico con una gran cantidad de parásitos, que coincide con la muerte de la ostra. Se cree que este parásito provocó altos índices de mortalidad en las ostras nativas (91% entre 1975 y 1992 en Foveaux Strait, Nueva Zelanda).

Existe una variación estacional en la infección, cuya alta frecuencia más alta se produce durante el otoño austral (Abril). Informes preliminares no publicados, escritos por de M.P. Hine (MAF Nueva Zelanda), indican que la *Bonamia* en ostras de Tasmania provoca una patología diferente, ya que es epiteliotrófica y, algunas veces, está asociada a abscesos focales.

● **Métodos de diagnóstico**

➤ **Análisis Histológico**

Realizar un corte transversal dorso ventralmente a través de los tejidos blandos y, luego, colocar inmediatamente en un medio de fijación o, dependiendo del tamaño del animal, realizar una fijación del animal completo, extraído de su concha, con un fijador Davidson por ejemplo, para así lograr la definición óptima del parásito.

Existen varias tinciones no específicas, como por ejemplo la hematoxilina-eosina, que permiten visualizar la *Bonamia*. Se recomienda analizar dos secciones a través de la cavidad cardíaca y las branquias por ostra. Las secciones no deben ser seriales.

Los parásitos (de tamaño 2-5 μm) se presentan dentro de los hemocitos o libres en el tejido conectivo o branquias, epitelio del manto o de las vísceras. Sin embargo, se deberá observar el parásito dentro del hemocito para lograr un diagnóstico positivo y, así, evitar los resultados positivos erróneos.

➤ **Análisis Citológico: impresiones de los tejidos**

Realizar tinciones de las impresiones de las ostras jóvenes o tejido cardíaco, de preferencia de los ventrículos, en un portaobjeto. Dejar secar los portaobjetos y fijarlos en etanol. Realizar la tinción de las impresiones preparadas utilizando un kit de tinción de sangre disponible en el

comercio, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la tinción, enjuagar los portaobjetos con agua potable, dejar secar con aire frío o tibio y colocar un cubreobjeto utilizando una resina sintética apropiada.

El parásito, de tamaño 2-5 μm , presenta un citoplasma basófilo y un núcleo eosinófilo (los colores pueden cambiar dependiendo de la tinción utilizada). Además, es posible visualizarlo al interior o exterior de los hemocitos. El tiempo suficiente para la observación es de diez minutos por portaobjeto (bajo inmersión de aceite y una magnificación de (800-1000X).

Con este método se logra la expansión de los organismos, comparados con aquellos observados en la histología. Las punciones cardiacas son inapropiadas para los stocks donde la infección, si existe, permanece epiteliotrófica.

➤ **Identificación Confirmatoria del Patógeno**

Análisis en microscopio electrónico de transmisión

Los procedimientos para realizar un análisis en microscopio electrónico de transmisión se incluyen en los procedimientos generales sobre técnicas de diagnóstico de enfermedades de molusco.

Existen ciertas diferencias entre la forma de la *Bonamia* sp. y la *Bonamia ostreae* tales como: cantidad de haplosporosomas y glóbulos de gran tamaño, morfología de la mitocondria, núcleo más pequeño y radio del citoplasma (OIE, 2000).

Las formas plasmodiales de la *Bonamia* sp. se distinguen por su tamaño (4.0-4.5 μm), perfil irregular de las células y el núcleo, inclusiones citoplasmáticas amorfas (cuerpos multi-vesiculares) y una serie de retículos endoplásmicos suaves con aparato de Golgi. Las formas de la densidad citoplásmica intermedia son más densas en electrones que las formas plasmodiales, además, son un poco más pequeñas en diámetro (3.0-3.5 μm). Los haplosporosomas se forman a partir de los complejos de material nuclear/Golgi y su construcción y estructura es similar a la de algunos virus.

2.-HAPLOSPORIDIOSIS

En el Manual OIE (2000) la Haplosporidiosis solo se refiere a las enfermedades provocadas por *Haplosporidium nelsoni* y *H. costale*. Otros *Haplosporidium* spp., infectan ostras y bivalvos. Hasta que no se conozca más acerca de la identidad y biología de estos otros *Haplosporidium* spp., su presencia en algún bivalvo se debe considerar como potencialmente peligrosa y se deberá consultar a un Laboratorio de Referencia de la OIE.

Haplosporidium nelsoni (MSX)

- Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad MSX (Esfera Multinucleada X), Haplosporidiosis, enfermedad de Bahía Delaware, Haplosporidiosis de la ostra del Pacífico.
- Nombre científico o afiliación taxonómica: *Haplosporidium nelsoni*, (= *Minchinia nelsoni*).
- Distribución geográfica: Desde el norte de Florida hasta Massachusetts y registrada en Maine. Las áreas enzoóticas están limitadas a la Bahía Delaware, con epizoóticas ocasionales en Bahía Chesapeake, área de Long Island y Cape Cod, Estados Unidos.
- La enfermedad está restringida a una salinidad de más de 15 ppt., ya que en una salinidad de 20ppt, se producen altos y rápidos índices de mortalidad. Existen algunas pruebas que demuestran que el agua a una temperatura superior a los 20°C puede provocar la desaparición de la enfermedad.

Existen informes sobre la presencia de *Haplosporidium* en *Crassostrea gigas* en California y Washington, en cultivos de *C. gigas* en Francia y una baja frecuencia observada en Korea.

Entre 1989-1990, se reportaron infectadas el 10% de las semillas analizadas de *C. gigas* provenientes de Japón y cuyo destino era California (Friedman et al. 1991).

- Especies Huésped: *Crassostrea virginica* (haplosporidios similares son encontrados en otras especies de bivalvos en el mundo) y *Crassostrea gigas*.

- Impacto en el Huésped
- La esporulación de MSX es esporádica en adultos de *C. virginica* pero frecuente en ostras juveniles. Cuando se presenta, esta ocurre en verano y provoca el desgarro gradual del epitelio del tubo digestivo. A diferencia de *Haplosporidium costale* (SSO), no hay formación de espora en el tejido conectivo y la esporulación es asincrónica, sin un punto máximo estacional marcado de mortalidad.

Las mortalidades pueden comenzar a principios de la primavera (animales infectados no pueden recuperar su demanda metabólica del invierno). La mortalidad por infecciones nuevas o recurrentes ocurren durante el verano y su punto más alto se produce durante Agosto-Septiembre. El ciclo de vida de MSX es desconocido. No se ha logrado la transmisión directa entre ostras; se sospecha que se necesita la presencia de un huésped intermedio.

Los análisis del ADN indican que *H. nelsoni* llegó a la costa este de Estados Unidos desde California o desde Asia, la cual tiene plantas donde está confirmada la presencia de *C. gigas*. Los efectos en *C. gigas* no han sido descritos pero algunos autores especulan que puede ser patogénico especialmente para ostras juveniles.

***Haplosporidium costale* (SSO)**

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la Enfermedad de la playa (Seaside disease), SSO, Enfermedad de alta salinidad.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Haplosporidium costale*, (= *Minchinia costalis*).
- ◆ Distribución geográfica: Long Island Sound, desde Nueva York al Cabo Charles, Virginia, Estados Unidos en aguas con altos índices de salinidad (más de 25 ppt).
- ◆ Especie huésped: *Crassostrea virginica*.
- ◆ Impacto en el Huésped

Provoca marcadas mortalidades estacionales (4-6 semanas) en Mayo y Junio.

Métodos de Diagnóstico

➤ Análisis Histológico

Realizar un corte sagital a través de la masa visceral, colocar la muestra en un fijador, como por ejemplo una solución de Carson o Davidson (la solución de Carson permite volver a utilizar las muestras para realizar una microscopía electrónica). La proporción no debe superar un volumen de tejido por 10 volúmenes de fijador.

Tratar todas las secciones en forma consecutiva utilizando los procedimientos histológicos convencionales. Es posible detectar las haplosporidias utilizando diferentes tinciones no específicas, como por ejemplo la Hematoxilina-eosina. Los plasmodios y esporas de *Haplosporidium costale* presentan esporoplasma de color rojo fuerte una vez que se realiza una tinción utilizando la técnica modificada de carbol fuccina Ziehl-Neelsen. Analizar dos secciones extraídas de dos lugares diferentes de la ostra.

Las diferentes etapas de los parásitos se pueden observar en las branquias, palpos, tejidos conectivos y epitelio de la glándula digestiva. Es posible observar esporas de MSX en las células del epitelio de los túbulos digestivos; además, las esporas de SSO se presentan en los tejidos conectivos.

El plasmodio multinucleado del *H. nelsoni* (4-30 μm en diámetro) se presenta en todo el tejido conectivo. Es posible detectar el plasmodio desde mediados de mayo a octubre. Las etapas esporogónicas (esporocitos de 20-50 μm en diámetro) y las esporas (4-6 μm x 5-8 μm) están restringidas al epitelio de la glándula digestiva. Los esporocitos tienen la capacidad de romper las células epiteliales digestivas, liberando así esporas maduras y en desarrollo al lumen de la glándula digestiva. Las esporas son muy comunes en las ostras jóvenes pero es muy poco probable que se presenten en ostras adultas.

En *Crassostrea gigas*, las etapas esporogónicas y las esporas no están restringidas al epitelio de la glándula digestiva, sino que también es posible que se presenten en otros tejidos. Es probable que la infiltración de hemocitos rodee al foci de las áreas plasmodiales y necróticas del tejido huésped (en etapas avanzadas de infección).

Es posible observar esporulación sincrónica del *H. costale* a través del tejido conectivo de la glándula digestiva, manto y gónadas; sin embargo, es muy poco probable que se presente en la glándula digestiva. Es posible detectar fácilmente el plasmodio entre marzo y junio.

Generalmente, las esporas de 3 μm de diámetro se detectan en ostras moribundas. No es posible detectar la presencia del parásito entre julio y marzo. Todas las etapas del *H. costale* duran la mitad de lo que duran las de *H. nelsoni* y no presentan esporas en el epitelio de los túbulos digestivos.

➤ **Análisis Citológico: impresiones de los tejidos**

Se recomienda utilizar ostras jóvenes para el análisis, debido a que la esporulación de *H. nelsoni* ocurre principalmente durante esta etapa.

Realizar un corte sagital a lo largo de la glándula digestiva y las branquias, extraer los excesos de agua colocando un papel absorbente en la muestra, luego, presionar esa área de la superficie cortada de la glándula digestiva, branquias y manto contra un portaobjeto de vidrio. Dejar secar los portaobjetos y luego fijar con metanol (2-3 minutos).

Realizar la tinción utilizando un kit de tinción para células plasmáticas disponible en el comercio, siguiendo las instrucciones del fabricante. Montar el cubreobjetos utilizando una resina sintética apropiada.

Las etapas del plasmodio (MSX: 4-30 μm y SSO 2-15 μm en tamaño) presentan un citoplasma basófilo (tinción más azul) con múltiples núcleos (cuyo color puede variar dependiendo de la tinción) eosinofílicos (tinción de color rojo). Estos núcleos se presentan principalmente en las branquias, palpos y tejidos conectivos. Además, en el *H. nelsoni* se presentan en el epitelio de la glándula digestiva.

➤ **Identificación Confirmatoria del Patógeno**

Análisis *in situ* de hibridación de *Haplosporidium nelsoni*

Hace muy poco se desarrolló la hibridación *in situ* para la diferenciación molecular entre *H. nelsoni* y *H. costale* (12). Para esta técnica es necesario poseer los conocimientos específicos, además del equipo adecuado. De esta forma, esta técnica está limitada a sólo algunos de los laboratorios de investigación. Sin embargo, con esta técnica se pueden resolver los problemas relacionados con la identificación de las especies. Es muy probable que muchos laboratorios

adopten esta técnica dentro de los próximos años. En el caso de *H. nelsoni*, se realizó una secuenciación del gen ARN ribosomal de la unidad más pequeña y se diseñó un ensayo probatorio específico.

El procedimiento para llevar a cabo esta técnica es el siguiente.

- i Realizar un corte sagital a lo largo de la masa visceral. Colocarlo en un fijador Davidson AFA (glicerina [10%], formalina [20%], etanol al 95% [30%], dH₂O [30%], ácido acético glacial [10%]) por al menos 24 horas. La proporción no debe superar 1 volumen de tejido por 10 volúmenes de fijador.
- ii En forma consecutiva, tratar las secciones siguiendo los procedimientos histológicos convencionales. Cortar secciones de 6 µm de grosor (no de 2 µm) y colocarlos en portaobjetos cubiertos con aminopropiltrióxido 3. Luego, colocar las secciones histológicas en un horno a 40°C, toda la noche.
- iii Extraer la parafina de las secciones, sumergiéndolas en xileno u otro agente clarificante menos tóxico, por un periodo de 10 minutos. Repetir este último paso y, luego, eliminar el solvente sumergiéndolas en dos baños consecutivos de etanol absoluto, por un periodo de 10 minutos. Luego, volver a hidratar sumergiendo las secciones en una serie de etanol. Lavar las secciones en una solución salina tamponada de fosfato (PBS).
- iv Tratar las secciones con proteinasa K, 100 µg/ml en PBS, a una temperatura de 37°C, por un periodo de 15 minutos. Luego, detener la reacción lavando las secciones en un baño de PBS con glicerina al 0,2%, por un periodo de 5 minutos. Colocar las secciones en 2 x SSC (citrato salino estándar).
- v Pre-hibridizar las secciones en una cámara húmeda a 42°C, por un periodo de una hora, en 300 µl de 4 x SSC, formamida al 50%, 5 x solución de Denhardt, 0,5 mg/ml de tARN de levadura, 0,5 mg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado.
- vi Luego, reemplazar la solución con un tampón de prehibridación que contenga 2 ng/µl de una prueba con un oligonucleótido marcado con digoxigenina. La secuencia oligonucleótido designado MSX1347 es 5'-ATG-TGT-TGG-TGA-CGC-TAA-CCG-3'. Cubrir las secciones con un cubreobjeto de plástico destinado a la hibridación *in situ* y colocarlas en un bloque caliente a 90°C, por un periodo de 12 minutos. Luego,

enfriar los portaobjetos en hielo (1 minuto) antes de dejar hibridizar toda la noche en una cámara húmeda a 42°C.

- vii Lavar dos veces las secciones por un periodo de 5 minutos en 2 x SSC a temperatura ambiente; dos veces, también por 5 minutos, en 1 x SSC a temperatura ambiente; y dos veces por 10 minutos, en 0,5 x SSC a 42°C. Luego, colocar las secciones en el tampón 1 (100 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl).
- viii Bloquear la reacción con 250 µl de tampón 1 (ver paso vii) suplementado con x-100 de Triton al 0,3% y 2% de suero de oveja, por un periodo de 30 minutos. Diluir un conjugado de fosfatasa alcalina-antidigoxigenina-, siguiendo las instrucciones del fabricante, en el tampón 1 suplementado con X-100 de Triton al 0,3% y un 1% de suero de oveja. Incubar las secciones por tres horas, a temperatura ambiente, en una cámara húmeda.
- ix Lavar por cinco minutos los portaobjetos en el tampón 1 (ver paso vii) y dos veces en el tampón 2 (también por 5 minutos cada uno) (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). Luego, cubrir los portaobjetos con 500 µl de una solución reveladora de color + 240 µg de levamisol, y volver a colocar en la cámara húmeda, por un periodo de dos horas en completa oscuridad. Detener la reacción del color en un baño de tampón TE (Tris, EDTA [ácido tetra acético diamino etileno]).
- x Más tarde, enjuagar los portaobjetos en dH₂O. Cortar y teñir las secciones y colocar un cubreobjeto utilizando una resina sintética apropiada. Demostrar la presencia de *H. nelsoni* marcando las células parasíticas.

Es muy importante incluir controles positivos y negativos en el procedimiento.

3.-MARTEILIOSIS

En el Manual de la OIE (2000) Marteiliosis solamente se refiere a las enfermedades causadas por *Marteilia refringens* y *M. sydneyi*. Otras *Marteilia spp.*, infectan ostras y otros bivalvos. Hasta que no se conozca más acerca de la identidad y biología de esas otras *Marteilia spp.*, su presencia en algún bivalvo debe considerarse como potencialmente peligrosa y se deberá consultar a un Laboratorio de Referencia de la OIE

Marteiliosis (Enfermedad de Abner)

Nombre común, generalmente aceptado del organismo o agente de la Enfermedad: Enfermedad de Aber, Enfermedad de la glándula digestiva de la ostra europea, Marteiliosis.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Marteilia refringens*, parásitos tipo *Marteilia*.
- ◆ Distribución geográfica: Europa del Atlántico, desde el sur del Reino Unido a Portugal (aunque hace dos años, un programa de muestreo de los años 90 indicó que *O. edulis* en Gran Bretaña estaba libre de la enfermedad), Costa este de Florida (posiblemente otra *Marteilia*), en *Argopecten gibbus*.
- ◆ Especies huésped: *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis*, *Cardium edule*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas* (posiblemente otra especie de *Marteilia*), *Tiostrea chilensis* (= *Ostrea lutaria*), *Ostrea angasi* (experimental), y *Argopecten gibbus* (posiblemente otra *Marteilia*).
- ◆ Se han descrito otras dos especies; *Marteilia maurini* en *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis* de la costa atlántica de España, Francia y Golfo Persico, y *Marteilia lengehi* en *Saccostrea* (= *Crassostrea*) *cucullata* del Golfo Persico. Debido a la imposibilidad de distinguir entre estas *Marteilias*, la validación de las últimas dos especies es cuestionable. Una tercera especie, *Marteilia christenseni* en un pelecípodo (*Scrobicularia piperata*) en Ronce-les-Bains, Francia, se puede diferenciar de las otras

especies por las características del contenido citoplasmático, contenido en el esporangio y la morfología de la espora

◆ Impacto en el Huésped

Bajo índice de condición con pérdida de glicógeno (escualidez), decoloración de la glándula digestiva, estancamiento del crecimiento, necrosis de tejido y mortalidades. Sin embargo, la *Marteilia* se puede presentar en algunas ostras sin causar enfermedad. Los factores causantes de la respuesta patogénica en el huésped no han sido claramente establecidos, pero pueden estar relacionados a stress ambiental o diferencias en la resistencia a la enfermedad en el stock.

Las mortalidades parecen estar relacionadas con la esporulación del parásito, la cual ocurre en las células epiteliales de los túbulos digestivos. Las primeras etapas se presentan en el epitelio de los ductos digestivos y, posiblemente, en las branquias.

***Marteilia sydneyi* (QX)**

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la Enfermedad QX.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Marteilia sydneyi*.
- ◆ Distribución geográfica: Costa este de Australia.
- ◆ Especies huésped: *Saccostrea* (= *Crassostrea*) *commercialis* y posiblemente también *Crassostrea echinata*.
- ◆ Existen informes de un protista similar en las almejas gigantes *Tridacna maxima*.
- ◆ Impacto en el Huésped

Normalmente, las ostras infectadas están en malas condiciones, y presentan sus gónadas completamente reabsorbidas.

La invasión masiva de *M. sydneyi* en las células epiteliales de la glándula digestiva, provoca una completa desorganización del tejido infectado. En menos de sesenta días, a contar de la infección inicial, se produce la muerte por inanición. La enfermedad no es estacional y se produce un alto índice de mortalidad durante todo el año.

Otras especies infecciosas: *Marteilia lengehi*, *Marteilia christenseni* y *Marteilia spp.*

- **Métodos de Diagnóstico**

- **Análisis Histológico**

Cortar una sección a través de la glándula digestiva para el análisis histológico, y colocar la muestra en un líquido de fijación, como por ejemplo Davidson o Carson. El fijador Carson permite re utilizar las muestras por si es necesario, someterlas a microscopía electrónica. La proporción no debe superar 1 volumen de tejido por 10 volúmenes de fijador.

Manipular en forma consecutiva las muestras, de acuerdo a los métodos histológicos clásicos (descritos en procedimientos generales).

Existe una amplia gama de tinciones no específicas que permiten detectar la presencia de *Marteilia refringens*, como por ejemplo hematoxilina-eosina, tricromo de Millot, debido a que estas tinciones no son muy específicas, la utilización de técnicas de tinción modificadas puede resaltar la detección del parásito. Se recomienda analizar dos secciones por cada ostra.

Las primeras etapas de la *Marteilia* se presentan en el epitelio del estómago, intestino y ductos digestivos. Las etapas más avanzadas se presentan en el epitelio de los túbulos digestivos. Además, también es posible observar esporangios libres en el lumen del intestino. *Marteilia spp.* posee la característica única que su división interna produce células dentro de las células durante la esporulación, característica que la diferencia del resto de los protistas.

- **Análisis Citológico: impresión de los tejidos**

Cortar una sección de la glándula digestiva para preparar una impresión; eliminar el exceso de agua colocando la muestra en un papel secante; realizar la impresión de las muestras que corresponden a las secciones que pasan desde el tracto digestivo al portaobjeto. Dejar secar los portaobjetos y, luego, fijar en metanol por 2-3 minutos.

Realizar la tinción de las muestras utilizando un kit de tinción disponible en el comercio para las células plasmáticas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la tinción, enjuagar con agua potable, dejar secar completamente y montar con un cubreobjeto utilizando una resina sintética apropiada.

El tamaño del parásito durante sus primeras etapas es de 5-8 μm y puede alcanzar los 40 μm durante la esporulación. La tinción del citoplasma de las células es basofílica y la del núcleo

eosinofílica. Las células secundarias o esporoblastos están rodeadas de una aureola brillante, cuyo color puede variar según la tinción utilizada. Observar por 10 minutos.

➤ **Identificación Confirmatoria del Patógeno**

Análisis con Microscopio Electrónico (ver procedimientos generales)

Las diferencias entre la *Marteilia sydneyi* con respecto a la *M. refrigens* son: ausencia de inclusiones estriadas en el plasmodio; formación de ocho a dieciséis primordios esporangios en cada plasmodio (en vez de ocho que tiene el *M. refrigens*), presencia de dos o tres esporas en cada esporangio (y no cuatro como el *M. refrigens*) y la presencia de una gruesa capa de membranas concéntricas rodeando las esporas *M. sydneyi* maduras.

4.- MIKROCYTOSIS

En el Manual de la OIE (2000) *Mikrocytosis* se refiere solamente a las enfermedades en ostras causadas por *Mikrocytos mackini* en la costa oeste de Canadá y *M. roughlery* en la costa este de Australia. Si se detecta fuera del rango conocido de *Mikrocytos spp.*, se debe utilizar la microscopía electrónica y las pruebas moleculares, si están disponibles, para identificar y distinguir el organismo detectado de otras especies de microcelulas (ejemplo *Bonamia* sp.). La presencia de este patógeno en algún bivalvo se debe considerar como potencialmente peligroso y se deberá consultar a un Laboratorio de Referencia de la OIE.

***Mikrocytos mackini* (Enfermedad de la Isla Denman)**

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la Enfermedad de la Isla Denman: Enfermedad de las microcélulas de la ostra del Pacífico.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Mikrocytos mackini*.
- ◆ Distribución geográfica: Costa oeste Canadiense, probablemente ubicada en todo el estrecho de Georgia y otras localidades específicas alrededor de Isla Vancouver.
- ◆ Especies huésped: *Crassostrea gigas* y *Ostrea conchaphila* (= *Ostrea lurida*); experimentalmente en *Crassostrea virginica* y *Ostrea edulis*.
- ◆ Impacto en el Huésped

Infección focal intracelular de las células del tejido conectivo vesicular, que provoca una infiltración hemocítica y necrosis de los tejidos. Las infecciones graves aparecen restringidas a ostras adultas (sobre dos años) y mortalidades (sobre 30% en ostras adultas a bajos niveles de marea) ocurren predominantemente en Abril y Mayo después de 3-4 meses, cuando las temperaturas son menores a 10 °C. Aproximadamente el 10% de las *C. gigas* infectadas se recuperan.

Crassostrea gigas parece ser más resistente a la enfermedad que otras especies de ostras infectadas experimentalmente en laboratorio.

***Mikrocytos roughleyi* (Enfermedad del Invierno Australiano)**

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la Enfermedad del Invierno Australiano, Enfermedad de las “microcélulas” de las ostras de roca de Sydney

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Mikrocytos roughleyi*, con inciertas afinidades taxonómicas.
- ◆ Distribución geográfica: New South Wales, Australia.
- ◆ Especies huésped: *Saccostrea commercialis*.
- ◆ Impacto en el Huésped

Una infección intracelular sistémica en los hemocitos que es asociada con abscesos focales tipo lesión en branquias, tejido conectivo y gonadal y tracto alimentario. La enfermedad es asociada con bajas temperaturas y altas salinidades (30-35 ppt).

Esta enfermedad puede matar sobre el 70% de las ostras de roca de Sydney maduras en su tercer invierno antes de su venta.

• **Métodos de Diagnóstico**

➤ **Análisis Histológico**

Para realizar el análisis histológico, cortar una sección a través del cuerpo de la ostra, incluyendo las pústulas, abscesos y úlceras, si existen. Colocar la muestra en un líquido fijador, como por ejemplo Davidson o Carson. El fijador Carson permite volver a utilizar las muestras para someterlas a microscopía electrónica. La proporción no debe superar un volumen de tejido por 10 volúmenes de fijador.

Posteriormente, manipular las muestras, siguiendo los métodos histológicos clásicos. Existe una variedad de tinciones no específicas que permiten detectar la presencia de *Mikrocytos*. Se recomienda utilizar hematoxilina-eosina; además, se recomienda analizar dos secciones por ostra, utilizando magnificación por inmersión en aceite.

Realizar un análisis de las células de los tejidos conectivos vesiculares adyacentes a las lesiones con apariencia de abscesos, para detectar la presencia de *Mikrocytos mackini* de 2-3 μm

de diámetro. También se ha detectado la presencia de este parásito en las células musculares, ocasionalmente en los hemocitos o libres dentro de la misma lesión.

En los abscesos es posible observar la presencia de *Mikrocytos roughleyi* dentro de los hemocitos y tienen la apariencia de organismos de 1-2 μm , con un núcleo esférico de más de 1 μm , con un contenido de estructuras nucleolares excéntricas o bipolares. Cuando se detecta su presencia, es probable que la vacuola citoplásmica desplace el núcleo y lo lleve hacia la periferia de la célula.

La diferencia entre *Mikrocytos roughleyi* y *Mikrocytos mackini* es que en el primero todas sus etapas se presentan en los hemocitos y, en el segundo, estas etapas generalmente ocurren en las células de los tejidos conectivos vesiculares de la periferia de las lesiones.

➤ **Métodos Probables de Diagnóstico**

Análisis Citológico: impresiones de los tejidos

Cortar una sección a través de los abscesos o úlceras (si existen); eliminar el exceso de agua colocando la muestra en un papel secante; colocar en un portaobjeto la muestra que corresponde a la sección que atraviesa el tejido infectado; dejar secar los portaobjetos y, luego, fijar con metanol (2-3 minutos).

Realizar la tinción utilizando uno de los kit de tinción que se encuentran disponibles en el mercado para células plasmáticas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Montar con cubreobjeto, utilizando una resina sintética apropiada.

Durante el análisis, el parásito, de 2-3 μm de diámetro, está separado de la célula huésped o, rara vez, en los hemocitos. Además, presenta el citoplasma de color azul (basofílico) y un núcleo rojo (eosinofílico). Por supuesto, los colores pueden variar, dependiendo de la tinción que se utilice. Analizar cada portaobjeto por un periodo de 10 minutos (mínimo 50 campos), utilizando magnificación de inmersión en aceite.

➤ **Identificación Confirmatoria del Patógeno**

Histología

Como se describió anteriormente, se debe considerar el análisis histológico como un método confirmatorio.

➤ **Análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión** (ver procedimientos generales)

M mackini y *Bonamia* tienen una diferencia en la morfología ultraestructural: los nucleolos de *M mackini* están ubicados hacia el centro del núcleo, mientras que en *B ostrae* tienen una ubicación excéntrica y, además, *M mackini* no presenta, aparentemente, mitocondria.

5.-PERKINSOSIS

En el Manual de la OIE (2000) Perkinsosis se refiere solamente a las enfermedades causadas por *Perkinsus marinus* y *P. olseni*. Otros *Perkinsus spp.*, infectan muchas especies de bivalvos en aguas tropicales y subtropicales. *Macoma baltica* en la costa este de Norteamérica, y *Tapes decussatus* y *T. philippinarum* en el Sur Este de Asia y Europa. Hasta que no se conozca más acerca de la identidad y biología de estos otros *Perkinsus spp.*, su presencia en algún bivalvo deberá ser vista como potencialmente seria y se deberá consultar a un Laboratorio de Referencia de la OIE

***Perkinsus marinus* (Enfermedad“Dermo”)**

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad *Perkinsus marinus*, Enfermedad "Dermo", Enfermedad proliferativa, Perkinsosis.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Perkinsus marinus* (= *Dermocystidium marinum*, = *Labyrinthomyxa marina*). El género *Perkinsus* fue originalmente ubicado en el Orden Perkinsida de la Clase Perkinsea dentro del Phylum Apicomplexa (Levine 1978). Análisis taxonómicos basados en secuencias de nucleótidos, indican que *Perkinsus* es filogenéticamente más cercano a los dinoflagelados y a coccidios y piroplasma apicomplexos, que a hongos y flagelados. Sin embargo, investigaciones recientes indican que este parásito puede no pertenecer al Phylum Apicomplexa, pero parece estar más cercanamente relacionado al Dinoflagellida (Goggin and Barker 1993, Perkins 1996, Siddall et al. 1997, Reece *et al* 1997b).
- ◆ Distribución geográfica: Costa este de Estados Unidos desde Massachusetts a Florida, a lo largo de la costa del Golfo a Venezuela y en Puerto Rico, Cuba y Brasil.
"Focos infecciosos" de infección han sido reportados en esta área (Brousseau et al. 1998). Accidentalmente introducida en Pearl Harbor, Hawaii. Desde 1990, el rango de extensión de esta enfermedad en Bahía Delaware, Nueva Jersey y Cape Cod, Maine, EE.UU., es atribuido a repetidas introducciones de algunos recursos, y a recientes incrementos en la temperatura superficial del mar, particularmente durante el invierno (Ford 1996, Cook et. al. 1998, Ford et al. 2000 a y b). En la mayoría de las áreas del

norte, las temperaturas para la proliferación de parásitos (sobre 20°C) son adecuadas sólo desde Junio a Septiembre.

- ◆ Especies huésped: *Crassostrea virginica* e infecciones experimentales de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea ariakensis* la cual parece ser más resistente a la enfermedad. Un patógeno similar a *Perkinsus* spp. ha sido reportado en una lista de 34 especies de moluscos de temperaturas cálidas de aguas tropicales en el océano Atlántico, Pacífico y mar Mediterráneo; desde 30 especies de bivalvos en la Gran Barrera de Arrecife y en cultivos de *Pinctada maxima* (ostras perlíferas) en Torres Strait, Australia (Norton et al. 1993, Perkins 1996).

- ◆ Impacto en el Huésped

Este endoparásito es uno de los factores primarios que afectan adversamente la abundancia y productividad de *C. virginica*. Los efectos de la infección en *C. virginica* van desde apariencia pálida de la glándula digestiva, y reducciones en el índice de condición, concentraciones de proteína en la hemolinfa y actividad del lisosoma, a un severo adelgazamiento, abertura de valvas, recogimiento del manto desde el borde de la valva, inhibición del desarrollo gonadal, disminución de la capacidad de reproducción, retardo del crecimiento y ocasionalmente la presencia de pústulas.

La proliferación del parásito causa trastornos sistémicos del tejido conectivo y células epiteliales, y es relacionado a temperaturas cálidas del agua en verano (sobre 20 °C) cuando la patogenicidad y mortalidades asociadas son altas. Algunas ostras pueden sobrevivir a la proliferación del parásito en verano pero no pueden reactivarse durante el letargo de invierno.

Mortalidades por sobre el 95% han ocurrido en *C. virginica* durante el segundo verano después de la transferencia de la enfermedad en áreas enzooticas.

Otras especies patógenas *Perkinsus olseni* y *Perkinsus* spp.

- **Métodos de Diagnóstico**

- **Métodos de Visualización**

Diagnóstico a través de un cultivo en un medio tioglicolato

Extraer muestras de tejido de 5 x 10 mm, de preferencia extraer muestras del recto de las ostras y de los músculos aductores o manto de los abalones. Colocar en el medio fluido de tioglicolato que contenga antibióticos (por ej. 0,5 mg/ml de benzilpenicilina). Incubar en total oscuridad a 22-25°C por un periodo de 4 a 7 días.

Los parásitos cultivados aumentan su tamaño desde 3-10 μm a 70-250 μm . Luego de la incubación, tomar fragmentos de tejido y colocarlos, durante diez minutos, en una solución de 1/5 de yodo Lugol. Luego, colocar en un portaobjeto con cubreobjeto para analizarlo en un microscopio mientras está en estado fresco. Las himnosporas *Perkinsus* tienen forma esférica y sus paredes se tornan azules o azul oscuro cuando se le aplica la solución de yodo Lugol.

- **Histología**

Realizar un corte sagital a lo largo de la masa visceral y colocar la muestra de tejido en un fijador, como por ejemplo un fluido Davidson. La proporción no debe superar 1 volumen de tejido por 10 volúmenes de fijador.

Procesar las muestras utilizando los procedimientos histológicos convencionales. Es posible detectar la presencia de *Perkinsus spp.* utilizando diferentes tinciones no específicas, como por ejemplo la hematoxilina-eosina. Analizar dos secciones por cada ostra.

Generalmente, la infección *Perkinsus marinus* tiene un carácter sistémico. En *P. olseni* la infección se localiza, generalmente, en los tejidos colectivos del músculo aductor y manto. De esta forma, es posible que los tejidos conectivos de todos los órganos alberguen trofozoitos inmaduros (merontes, merocitos o aplanosporas de 2-3 μm de diámetro), etapas “sortijas con sello” (trofozoitos, merontes, merocitos o aplanosporas maduras de 3-10 μm de diámetro, cada una con un gran contenido de vacuola excéntrica) y “rosetas” (tomontes, esporangia o esquizontes de 4-15 μm con un contenido de 2, 4, 8, 16 o 32 trofozoitos en desarrollo).

Generalmente, los trofozoitos se caracterizan por la presencia de una vacuola que desplaza el núcleo hacia la periferia. Al utilizar la tinción hematoxilina-eosina, el citoplasma de los trofozoitos se torna rosado y el núcleo toma un color azul. Dependiendo de la especie, el tamaño de los trofozoitos varía entre 7 μm (*P. marinus*) y 13-16 μm (*P. olseni*). Sin embargo, los caracteres morfológicos no son suficientes para agrupar o separar las diferentes *Perkinsus spp.*

➤ **Diagnóstico a través de un cultivo en un medio de Tioglicolato**

Como se describió anteriormente, este método se puede utilizar como un método de diagnóstico presunto.

➤ **Identificación Confirmatoria del Patógeno**

Análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión (ver procedimientos generales)

Una de las principales características de las especies *Perkinsus*, es la ultraestructura de la zoospora. En *P. marinus* se produjeron las zoosporas transfiriendo las prezoosporangia, desde un medio tioglicolato (como se describió anteriormente) al agua de mar, donde luego evolucionaron a zoosporangias, las cuales producen cientos de zoosporas biflagelas móviles. El flagelo anterior se ornamenta con estructuras parecidas a las del pelo o a la de una espuela. El flagelo posterior es liso. Las zoosporas contienen un complejo apical que consiste en un conoide, microtúbulos subpeliculares, minocronemos rectilineales y micronemes asociados a los conoides. Además, se presentan vacuolas de gran tamaño en el extremo anterior de la zoospora.

6.-POLIQUETOS PERFORADORES DE LAS VALVAS DE LAS OSTRAS (Polydora)

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad:
Poliquetos perforadores de las valvas, gusanos de ampollas de lodo.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica *Polydora* spp.
- ◆ Distribución geográfica: Distribución global, aunque algunas especies probablemente tienen distribución limitada.
- ◆ Especies Huésped: *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Saccostrea commercialis* y varias especies de bivalvos que viven en la superficie de sustrato incluyendo mitílidos, ostiones y abalones.
- ◆ Impacto en el Huésped

La mayoría de las infecciones son inocuas y son usualmente agujeros de baja intensidad (con poco o nada de fango) en la valva. Sin embargo, en la costa este y oeste de Norteamérica, *Polydora websteri* y *Polydora ligni* en *Crassostrea virginica* puede causar burbujas de lodo antiestéticas en las valvas y abscesos amarillentos en el músculo aductor.

La frecuencia e intensidad varía considerablemente con las condiciones locales. La infección raramente causa mortalidades, y las ostras infectadas pueden venderse. Sin embargo, las burbujas de barro puede interferir con apariencia y reducir el valor comercial de las ostras al ser servidas en su misma valva.

7.-VIBRIOSIS LARVAL Y JUVENIL DE LAS OSTRAS (*Vibrio* spp.)

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad: Necrosis bacilaria, necrosis larval Vibriosis juvenil

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: *Vibrio tubiashi* y *Vibrio* spp. *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio* sp.
- ◆ Distribución geográfica: En todas las aguas marinas donde el cultivo de bivalvos en hatchery es practicado. Es un problema generalmente sólo en los meses calidos. *Vibrio tubiashi* fue aislado específicamente en la costa noreste atlántico de los Estados Unidos y costa sudeste de Inglaterra. Tres hatcheries en Maine, USA.
- ◆ Especies huésped: *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* y otras larvas de bivalvos cultivados. *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* y otros moluscos juveniles cultivados, incluyendo almejas, ostiones y abalones.
- ◆ Impacto en el Huésped
Infección sistémica de los tejidos blandos de los juveniles y larva, lo que resulta en necrosis del tejido (debido a la producción de exotoxina por la bacteria) y muerte.

Técnicas de Diagnóstico

Histología

Indicaciones de necrosis de tejido y la presencia de bacterias con forma de bacilos (ligeramente curvados) dentro de los tejidos.

Cultivo: Aislamiento y cultivo de colonias de *Vibrio* desde tejidos de ostras enfermas en Agar de cultivo bacteriano TCBS

8.-NEOPLASIA HEMOCÍTICA DE LAS OSTRAS

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad:
Neoplasia Hematopoyética, Hémica o Hemocítica, HCN.

- ◆ Nombre Científico o Afiliación Taxonómica: Etiología desconocida.
- ◆ Distribución Geográfica: Europa, Chile, Australia, Japón y las costas Pacífico, Atlántico y del Golfo de Estados Unidos.
- ◆ Especie Huésped: *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ostrea conchaphila* (= *Ostrea lurida*), *Saccostrea commercialis*, *Tiostrea* (= *Ostrea*) *chilensis*; (además, también se han infectado las almejas y mitílidos).

Impacto en el Huésped

Aparición gradual de hemocitos neoplásicos a través de los tejidos suaves con una disrupción asociada de la función normal de los hemocitos. La condición neoplásica no está relacionada a las neoplasias humanas, sin embargo, se asimila a la leucemia en la forma que ataca al bivalvo. Existen informes de que esta enfermedad se ha presentado en diferentes poblaciones, las cuales no sufren una mortalidad de asociación directa. En aquellas poblaciones donde se presentan mortalidades en forma anual, es posible perder cerca del 30-50%, especialmente durante el otoño y el invierno. Hasta la fecha, no se ha detectado una correlación consecuente entre la contaminación y la presencia de HCN. Sin embargo, parece que la enfermedad es infecciosa y puede afectar a casi el 100% de los bivalvos cultivados en forma intensa. Aún no se ha demostrado el hecho que estas neoplasias estén relacionadas con un virus.

Técnicas de Diagnóstico

- **Histocitología:** Examinar los hemocitos para detectar las características antes descritas. Los hemocitos enfermos toman forma esférica y no presentan adherenciaseudópodica al portaobjeto.
- **Histología:** Infiltración intensa de hemocitos anormales, los cuales presentan muy poco citoplasma en comparación al nucleoplasma y un núcleo generalmente pleomórfico y extendido. Además, presentan figuras mitóticas obvias. La proliferación en masa de los

hemocitos puede provocar una diapédesis de un gran grupo de células y/o oclusión vascular en los casos más graves.

- **B.-MITILIDOS**

1. **POLIKETOS PERFORADORES DE LA VALVA DE MITILIDOS**

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad:
Poliquetos perforadores, gusano de ampollas de barro.

- ◆ Nombre Científico o Afiliación taxonómica: *Polydora* spp.
- ◆ Distribución Geográfica: Global, sin embargo algunas especies tienen probablemente distribución limitada.
- ◆ Especies Huésped: *Mytilus edulis* y varias especies de bivalvos que viven en la superficie del sustrato incluyendo ostras, ostiones y abalones.
- ◆ Impacto en el huésped

La mayoría de las infecciones son inocuas y usualmente de baja intensidad con perforaciones limitadas al lado externo de la valva. En las aguas de Norteamérica, las perforaciones raramente penetran a través de la superficie interna de la valva. Sin embargo, en las aguas europeas, mortalidades, un bajo índice de condición y pérdida de calidad para la comercialización en Mitílidos azules, fueron causadas por *Polydora ciliata*.

Las perforaciones de *P. ciliata* en mitílidos azules no solamente causa ampollas de barro antiestéticas sino también debilitan las. ampollas de nácar producidas por mitílidos azules en respuesta a *P. ciliata* pueden resultar en una atrofia y no funcionamiento del músculo aductor y posiblemente interfiera con la producción de gametos cuando las protuberancias calcáreas aparecen cerca de estos órganos.

En dos lugares del sur de Australia , *M. edulis* tuvo serios daños en las valvas atribuido a *Polydora*.

Técnicas de Diagnóstico

Observación microscópica: Ubicar la valva limpia contra una luz brillante y examine a través de la matriz de la valva para ver las perforaciones sinuosas de cerca de 2 mm de diámetro, las ampollas de nácar o manchas de barro y debris de aproximadamente 1 cm de diámetro.

Montajes húmedos: Para la identificación específica del poliqueto debe ser removido intacto desde la valva. Quiebre la valva a lo largo de las perforaciones usando un instrumento apropiado. Sumerja los fragmentos de valva en agua de mar fresca y extraiga intacto el poliqueto vivo desde la perforación con pinzas y aguja. Ponga el gusano en un trozo de plasticina y, usando alfileres mantenga su cuerpo estirado. Sumérjalo en 70% alcohol y depositelo en 50-70% de alcohol isopropílico. Nota: estos procedimientos son muy laboriosos y demandan mucho tiempo. Para otras técnicas ver Knudsen (1966).

2. NEOPLASIA HEMOCITICA DE LOS MITILIDOS

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad:

Neoplasia Hemocítica, Hematopoyética o Hemica, HCN.

- ◆ Nombre científico o afiliación taxonómica: desconocida. Sin embargo, se puede presentar por diferentes causas, representando así un complejo de enfermedades. Además, es posible que esté relacionada con un retrovirus en algunos de los casos que se han presentado en América del Norte y Europa. Recientemente ha sido reportada en Chile (Campalans et al. 1998).
- ◆ Distribución Geográfica: Reino Unido, Escandinavia, América del Norte Oriental y Occidental, incluyendo Canadá.
- ◆ Especie Huésped: *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus* y *Mytilus galloprovincialis*. Además, también se presenta en ostras y almejas, sin embargo, su etiología es diferente.
- ◆ Impacto en el Huésped: Se presentan los hemocitos neoplásicos y, en forma progresiva, reemplazan a los hemocitos y procesos fisiológicos normales. Generalmente, su predominio es menor al 4% en los mitílidos de Europa y la costa este de América del Norte. Sin embargo, su predominio puede exceder el 40% en algunos lugares de la costa oeste de América del Norte. En los *M. trossulus* provenientes de Puget Sound, Washington, E.E.U.U. y British Columbia y Canadá, es posible que la neoplasia hemocítica se transmita por medio de la cohabitación, es una enfermedad progresiva, que presenta mecanismos de defensa impares y, además, es letal. Comúnmente, las mortalidades acumulativas anuales sobrepasan el 75% en los mitílidos que presentan una concha de más de 4 cm. No obstante, es posible observar una disminución de entre el 10% y el 20% en los mitílidos analizados. A pesar de la probabilidad que la neoplasia hemocítica juegue un papel importante en los altos índices de mortalidad, la vida de los stocks de mitílidos presentes en esta área es muy corta, en comparación a algunos stocks o especies de ellos presentes en la costa este de Canadá, y, además, presentan un ciclo de vida en donde luego de la reproducción,

se presenta la senescencia y la muerte. Es posible que la neoplasia hemocítica sea una de las tantas consecuencias de la senescencia en estos mitílidos. Algunos hechos que apoyan esta visión es el hecho que no existe un déficit de mitílidos pequeños y, además, que el nivel de reclutamiento es alto, a pesar de la presencia común de la neoplasia hemocítica y los altos niveles de mortalidad después de los 12 meses de edad. Por otra parte, otros stocks y/o especies de mitílidos parecen ser resistentes al tipo de neoplasia hemocítica propia de la costa oeste.

Técnicas de Diagnóstico

Frotis: de hemolinfa del corazón que presente varios hemocitos anormales, así como se describe a través de la histología.

Histología: Infiltración interna de hemocitos anormales, los cuales presentan muy poco citoplasma con relación al nucleoplasma y, además, presentan un núcleo extendido y generalmente pleomórfico, y la presencia de figuras mitóticas obvias. Es posible que la proliferación en masa de los hemocitos provoque una diapédesis de grandes cúmulos de células y/o oclusiones vasculares en los casos más graves.

Histocitología: Analizar los hemocitos de manera de detectar las características descritas bajo histología. Los hemocitos infectados presentan forma esférica y no presentan adhesión pseudopodial al portaobjeto.

C.-PECTINIDOS

1. VIBRIOSIS LARVAL (*Vibrio spp.*)

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad: Vibriosis larval, necrosis bacilar.

- ◆ Nombre Científico o Afiliación Taxonómica: *Vibrio splendidus*, *Vibrio spp.*
- ◆ Distribución Geográfica: Costa nordeste de Estados Unidos, British Columbia y Argenton, Francia (criadero). En Chile han sido reportadas las especies *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio sp* y *Vibrio anguillarum* (Riquelme et al. 1995).
- ◆ Especies Huésped: *Argopecten irradians*, *Patinopecten yessoensis*, *Pecten maximus* y otras larvas bivalvas de cultivo incluyendo ostras, almejas y abalones.
- ◆ Impacto en el Huésped

Infección sistémica de los tejidos blandos de las larvas, que posteriormente provocan necrosis en los tejidos (debido a la producción de exotina por parte de la bacteria) y muerte. Los protozoos ciliados se pueden presentar como invasores secundarios de las larvas que presentan vibriosis.

La vibriosis larval es uno de los principales problemas que afecta a larvas de ostiones de cultivo en Chile y se encuentra en asociación con *Moraxella*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, causando mortalidades de hasta un 96% en larvas de 48 hrs. de vida (Riquelme et al. 1995, Riquelme et al. 1996).

Técnicas de Diagnóstico

Histología: Indicios de necrosis en los tejidos y presencia de bacterias con forma de bastoncillo (generalmente un poco curvadas) dentro de los tejidos.

Cultivo: aislamiento y cultivo (agar de cultivo bacteriano TCBS) de las colonias de *Vibrio* provenientes de los tejidos de las larvas enfermas de pectínidos.

Métodos de Control

Las bacterias del tipo *Vibrio* son ubicuas por lo que es imposible erradicar el agente etiológico. Al parecer, la vibriosis está directamente relacionada con un manejo deficiente. Las fuentes de infección son los reproductores, cultivos de algas y agua de mar entrante. Se deben destruir los grupos de individuos infectados, utilizando métodos aprobados; desinfectar todos los contenedores y equipos que tuvieron contacto con el grupo infectado.

2. POLIQUETOS PERFORADORES DE LA VALVA DE PECTÍNIDOS

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad:
Poliquetos excavadores de conchas

- ◆ Nombre Científico o Afiliación Taxonómica: *Polydora* spp. y *Dodecaceria concharum*.
- ◆ Distribución Geográfica: Ubicua, aunque probablemente algunas especies tienen una distribución limitada.
- ◆ Especie del Huésped: *Patinopecten yessoensis*, *Crassidoma giganteum*, *Placopecten magellanicus* y otras especies de bivalvos que viven en la superficie de los substratos, incluyendo ostras, choritos y abalones.
- ◆ Impacto en el Huésped

La mayor parte de las infecciones son inocuas y de baja intensidad, con la excavación hacia el interior de la concha. Sin embargo, las conchas atrofiadas y con un espesor anormal y las altas mortalidades provocadas por las altas intensidades (demasiadas excavaciones y vinculadas en las conchas de los pectínidos muertos) de *P. websteri* han impedido el cultivo de los *P. yessoensis* introducidos en algunas localidades (Bower, 1990). En Japón, Mori et al. (1985) planteó la posibilidad que *Polydora* tuviese un efecto adverso en el crecimiento de los pectínidos japoneses pertenecientes a algunas áreas. Además, el engrosamiento de las conchas (3-4 de pliegue) que realizan algunos pectínidos para evitar la penetración de los poliquetos a los tejidos vivos, disminuye la capacidad natatoria de los pectínidos, lo que finalmente los hace más accesibles a los depredadores (ej. Estrellas de mar). La perforación de la concha realizada por el *P. magellanicus* puede provocar filtración de barro, el cual utilizan los poliquetos para trazar sus túneles, y, además, a la formación de burbujas de barro en la superficie interior de la de la concha. Es posible que estas burbujas ocupen una gran proporción del espacio de la cavidad del manto; no obstante, esto parece no afectar al pectínido, a menos que las burbujas eviten la ligación del músculo abductor.

Técnicas de Diagnóstico

Observaciones Generales: Sostener la concha limpia contra luz y analizar a través de la matriz de la concha para detectar excavaciones sinuosas de casi 2 mm de diámetro.

Montajes Húmedos: Extraer los poliquetos de la concha, tratando de mantenerlos intactos para lograr una identificación específica. Partir la concha a través de la excavación utilizando tijeras para cortar huesos. Sumergir los fragmentos de la concha en agua de mar bien helada y extraer el poliqueto vivo intacto utilizando una aguja y bisturí. Colocar el gusano en un pedazo de plasticina y, colocando alfileres en los extremos del cuerpo para mantenerlo quieto, inundar con alcohol al 70% y, luego, almacenar en alcohol isopropil al 50-70%.

Nota: Estos procedimientos no son fáciles y requieren de bastante tiempo. Para ver otras técnicas, remitirse a Knudsen (1966).

Métodos de Control

Es posible disminuir la frecuencia e intensidad de la infección evitando cultivar pectínidos en las localidades donde se han detectado altas intensidades de *P. websteri* y, además, realizando los cultivos de los pectínidos en otras áreas.

3. TRICODINAS DE LA BRANQUIA DE PECTINIDOS

Nombre común y generalmente aceptado para el organismo o agente de la enfermedad:

Tricodinas de las Branquias

- ◆ Nombre Científico o Afiliación Taxonómica: Ciliado de tricodinas no identificado. *Trichodina pectenis*, *Trichodina* sp.
- ◆ Distribución Geográfica: Pectínidos marinos de Canadá Atlántico. Sin embargo, es probable que su distribución sea aún más amplia, incluyendo una variedad de bivalvos marinos, tales como ostras, almejas y berberechos. Golfo de Pedro el Grande (Mar de Japón).
- ◆ Especies del Huésped: *Placopecten magellanicus*, *Patinopecten yessoensis*
- ◆ Impacto en el Huésped

Hasta la fecha, todos los análisis están basados en la histología. La presencia de más de 71 tricodinas por sección de tejido no muestra respuesta del huésped (frecuencia de 0-90%, 1-71 por sección).

Frecuencia varía desde 20-100% sin patología directa asociada. Es posible que jueguen un rol de parásitos secundarios, ya que generalmente se presentan en grandes cantidades en el cuerpo de los pectínidos debilitados.

Técnicas de Diagnóstico

Histología: Protista con forma de disco, que se caracteriza por un pequeño círculo de dentículos eosinofílicos, margen ciliado y un núcleo con forma de pie de caballo.

Métodos de Control

No existe ningún método de control o prevención conocido. Los administradores de las áreas que actualmente se encuentran libres de estos ciliados tratan de evitar su introducción.

IV.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Boudry, P., B. Chatain, Y. Naciri-Graven, C. Lemaire and Andr rard. 1996. Genetical improvement of marine fish and shellfish: a French perspective. Proceeding of FOID'96 5:141-150.
- Bower, S.M.; Blackburn, J; Nishimura, D.J.H. and Meyer, G.R. 1990. Diseases of cultured Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) in British Columbia, Canada. In: A. Figueras (ed). Abstracts, Fourth International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. 17-21 September 1990, Vigo (Pontevedra), Spain, Instituto de Investigaciones Marinas-CSIC, Vigo, P. 67-68.
- Campalans, M.; Rojas, P.; Sepúlveda, J.; Pascual, J.; Guerrero, I; Riquelme, C. y Castro, R. 1997. Desarrollo de un Programa de Detección y Tratamiento de Enfermedades en Moluscos Cultivados en Chile. Proyecto FIP N 95-32/97.
- Cook, T.; M. Folli; J. Klenck.; s. Ford and I. Miller. 1998. The relationship between increasing sea-surface temperature and the northward spread of *Perkinsus maximus* (Dermo) disease epizootics in oysters. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 46:587-597.
- Elston, R. 1994. Diseases of shellfish. In: J.C. Thoesen (Editor), Suggested Procedures for the detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens. 4th Edition, version 1, Fish Health Section, American Fisheries Society.
- Elston, R.A. 1991. Bacteriological methods for diseases shellfish. In: Austin, B. y B.A. Austin (Eds) 1991. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. John Wiley & Sons. NY 316 pp.
- Elston, R.A. 1990. Mollusks diseases guide for the shellfish farmer. Washington Sea Grant Program. Seattle- 73 pp.
- Farley, C.A.; Wolf, P:H: and Elston. 1988. A long-term study of "microcell" disease in oysters with description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.) and two new species *Mikrocytos mackini* (sp.n) and *Mikrocytos rougleyi* (sp.n). U.S. National Marine Fish Service Bulletin 86:581-593.
- Ford, S.,R. Smolowitz and M. Chintala. 2000^a. The question of temperature and *Perkinsus marinus* (Dermo) activity in the northeastern United Sates. Journal of Shellfish Research 19: 571 (Abstract).

- Ford, S.E., R. Smolowitz and M.M. Chintala. 2000b. Temperature and range extension by *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 19: 598 (Abstract).
- Ford, S.E. 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change?. Journal of Shellfish Research 15:45-56.
- Friedman, C:S:, J.H. Beattie, R.A. Elston and R.P. Hedrick, 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Thunberg. Aquaculture 94:1-15
- Goggin, C.L., And S.C. Barker. 1993. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal R.N.A., Molecular and Biochemical Parasitology 60:65-70.
- Hine, P.M. 1992. Ultrastructural and ultracytochemical observations on *Bonamia sp.* in oysters (*Tiostrea chilensis*) with a consideration of organella function. Aquaculture 107:175-183.
- Knudsen, J.W. 1966. Biological Techniques-Collecting, Preserving, and Illustrating Plants and Animals. Harper and Row, New York. p 157-160.
- Levine, N. D. 1978. *Perkinsus* gen. and other new taxa in the Protozoan phylum Api complexa. Parasitology 64:549.
- McGladdery, S.E. and Bower, S.M. 1999. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Malpeque Disease of Oysters. URL: <http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/scalance/aquac/pages/maldisoy.htm>.
- Merers, T.R. 1981. Endemic didymocystid infections of cultured shellfish of Long Island, New York: adult and juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). Aquaculture 22:305-330.
- Mialhe, E.; Boulo, V; Bachere, E.; Hervio, D.; Cousin, K.; Noel, C.; Ohresser, M.; le Deuff, R. M.; Despres, B.; and Gendreau, S. 1992. Development of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusk and shrimp aquaculture. Aquaculture. 107:155-164.

- Mori, K.; Sato, W.; Nomura, T. and Imajina, M. 1985. Infestation of the Japanese scallop *Patinopecten yessoenus* by the boring polychaetes, *Polydora*, on the Okhotsk Sea coast of Hokkaido, especially in Abashiri waters. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 51:371-380. (In Japanese, with English abstract).
- Norton, J.H., M.A. Sheperd, F.O. Perkins and H.C. Prior. 1993. *Perkinsus*-like infection in farmed golden-lipped pearl oyster *Pinctada maxima* from the Torres Strait, Australia. Journal of Invertebrate Pathology 62:105-106.
- Office International des Epizooties. 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Tercera edición, 153 pp. París Francia
- Pauley, G.B., Chew, K.K. and Sparks, A.K. 1967. Experimental infection of oysters (*Crassostrea gigas*) with thigmotrichid ciliates. Journal of Invertebrate Pathology 9:230-234.
- Perkins, F.O. 1996. The structure of *Perkinsus maximus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. Journal of Shellfish Research 15:67-87-
- Pernas, M., Novoa, B.; Berthe, F.; Tafalla, A. and Figueras, A. 2001. Molecular methods for the diagnosis of *Marteilia refringens*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. Vol. 21(5):200-208.
- Reece, K.S., M.E. Shiddall, E.M. Burreson and J.E. Graves. 1997b. Phylogenetic analysis of *Perkinsus marinus* strains based on actin gene sequences. The Journal of Parasitology 83: 417-423.
- Riquelme C.; Hayashida, G.; Toranzo, A. E.; Vilches, J. y P. Chavez. 1995. Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. Diseases of Aquatic Organisms Vol. 22:135-141.
- Riquelme, C.; G. Hayashida; N. Vergara; A. Vasquez; Y. Morales y P. Chavez. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1919) cultured in Chile. Aquaculture 138:49-60.
- Riquelme, C.; G. Hayashida; R. Araya; A. Uchida; M. Satomi and Y. Ishida. 1996. Isolation a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic Vibrios. Journal of Shellfish Research. Vol. 15 N° 2:369-374.

- Riquelme, C.; A.E. Toranzo; J.L. Barja; N. Vergara y R. Araya. 1996. Association of *Aeromonas hydrophyla* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of Scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology* 67:213-218
- .Roblero, J.A.F.; Santarém, M.M. and Figueras, A. 1994. Parasite loads of rafted blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Spain with with special reference to the copepod, *Mytilicola intestinalis*. *Aquaculture* 127:287-302.
- Siddall, M.E., K.S. Reece, J.E. Graves and E.M. Burreson. 1997. “Total evidences refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa-Parasitology 115:165-176.
- Toesen, J.C. (Ed.). 1994. Blue Book. Versión 1. Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Fin fish and Shellfish Pathogens. Fourth Edition. Fish Health Section. American Fisheries Society. Paginas actualizadas www.Fisheries.org/fhs/bluebook.htm