



Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile

AUTOR(ES)

Smith, Pedro; Larenas, Julio; Vera, Paola; , Contreras, Jorge; Venegas, Claudia; Rojas, María E.; Guajardo, Alvaro

Unidad de Patología de Animales Acuáticos, Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Precuarias, Universidad de Chile

CORRESPONDENCIA

Santa Rosa 11735
La Pintana, Santiago Chile.

CITA

Smith, Pedro; Larenas, Julio; Vera, Paola. et al. Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.21(2), diciembre 2001.

[Introducción]

Si bien no es el único factor de importancia, la experiencia en muchos lugares del mundo ha demostrado que la situación sanitaria de los peces juega un papel preponderante en el resultado técnico y/o económico de un establecimiento de acuicultura. A mayor escala, este aspecto puede también ser determinante en el éxito o el fracaso de toda una industria orientada al cultivo artificial de peces en un país determinado.

En Chile, como es conocido, el cultivo de salmones, con una etapa de crecimiento en balsas-jaulas marinas, ha tenido un desarrollo realmente formidable. Esta industria se fue incubando en nuestro país con las experiencias pioneras realizadas a finales de la década del 70 e inicios de los 80 del siglo recién pasado. En ese entonces, agentes del sector público y especialmente empresarios privados visualizaron una gran oportunidad para generar riqueza con esta actividad, debido a un conjunto de ventajas comparativas que en este sentido presentaba nuestro país, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes: a) la presencia de condiciones naturales, geográficas y climáticas (costas protegidas, temperaturas de las aguas etc.), extraordinariamente adecuadas para el cultivo de especies salmonídeas, b) una atmósfera económica favorable para la inversión y la actividad empresarial, c) presencia de una elevada calidad de recursos humanos (profesionales, técnicos y obreros), d) disponibilidad de harina de pescado y e) una supuesta ausencia (o mínima cantidad) de microorganismos patógenos para las especies salmonídeas en nuestros ecosistemas acuáticos. Luego de sus inicios, los niveles de producción han crecido sostenidamente en forma prácticamente ininterrumpida, a excepción del año 1999, alcanzando un volumen de cosecha bruta el año pasado de un total aproximado de 240 mil toneladas métricas.

Aun cuando en Chile no se han detectado algunas de las más importantes afecciones patológicas de las especies salmonídeas cultivadas en el hemisferio norte, desafortunadamente la ventaja relacionada con un ambiente prácticamente libre de enfermedades para estos peces se ha ido perdiendo paulatinamente a través de estas dos décadas. Esta situación se explicaría en gran parte por la introducción de patógenos

exóticos, principalmente a través de las ovas importadas. Baste mencionar que Chile ha importado más de mil millones de ovas en estos años desde diversos países y continentes del hemisferio norte (Europa, Norteamérica y Asia). Es un hecho conocido que al mover peces, o sus gametos, sus agentes patógenos se trasladan en conjunto con ellos. No obstante lo anterior, en el caso de algunas enfermedades que han adquirido los salmones cultivados en Chile, también es posible que haya ocurrido un fenómeno relativamente opuesto, es decir que algunos agentes etiológicos desconocidos hayan estado en forma endémica en nuestras especies nativas sin causarles un daño aparente y se hayan adaptado a estas especies de peces foráneas, las que a su vez no tendrían una constitución genética adecuada, ni memoria inmunológica, para responder con mecanismos de defensa efectivos frente a estos nuevos microorganismos.

Las enormes biomásas que se cultivan, en conjunto con las elevadas densidades de éstas por unidad de volumen de agua, han contribuido tanto a aumentar la población de agentes patógenos como a incrementar las tasas de contacto con los hospederos, todo lo cual se traduce en un mayor riesgo de enfermar. En contrapartida, las mejoras en ciertos aspectos del manejo sanitario así como de apoyo científico, profesional y técnico especializado han actuado favoreciendo la mitigación de las permanentes y crecientes amenazas al estado de salud de estas poblaciones de peces.

En cualquier caso, el hecho es que paulatinamente se han ido detectando y estableciendo nuevas condiciones patológicas en nuestros peces salmonídeos cultivados artificialmente, de modo que actualmente se han descrito decenas de enfermedades, lo que está complicando en forma creciente la situación sanitaria de estos animales acuáticos. La mayoría, y las más importantes desde el punto de vista económico, las constituyen las enfermedades infecciosas, particularmente las bacterianas y virales, pero también existe un número significativo de afecciones, de una gran variedad de otros orígenes, que en oportunidades también pueden tener resultados catastróficos. Algunos ejemplos de estas últimas la constituyen las mortalidades ocasionadas producto del aumento explosivo de las poblaciones de fitoplancton en una zona determinada y el ataque de lobos marinos en las jaulas mantenidas en instalaciones marinas.

Respecto de las enfermedades causadas por agentes infecciosos, en Chile se han detectado las de tipo bacterianas, virales, parasitarias y micóticas.

Entre las principales de cada tipo se pueden mencionar:

Bacterianas: Piscirickettsiosis, enfermedad bacteriana del riñón (BKD), Síndrome del alevín de trucha arco iris (RTFS), enfermedad columnaris, enfermedad entérica de la boca roja, estreptococosis, etc.

Virales: Necrosis pancreática infecciosa (IPN), necrosis eritrocítica viral (VEN), síndrome del cuerpo de inclusión eritrocítico (EIBS), enfermedad asociada a un ortomyxovirus similar al virus de la anemia infecciosa de los salmones (ISA) y leucemia plasmacitoídea (de posible etiología viral).

Parasitarias: Caligidosis, parasitismo por *Ceratohoa*, enfermedad del punto blanco, mixosporidiasis (*Kudoa* sp.), microsporidiasis (*Loma* sp., *Nucleospora salmonis*), *Hysterothylacium*, difilobotriasis, diplostomiasis, etc.

Micóticas: Saprolegniasis, infección por *Exophiala salmonis* y micotoxicosis.

Una revisión detallada de las numerosas enfermedades que se han descrito en peces salmonídeos en Chile sería demasiado extensa y superaría ampliamente los propósitos de este manuscrito. Por otra parte, un simple listado de enfermedades acompañado de

una reseña explicativa telegráfica de cada una de ellas, tampoco parece ser una contribución que tenga alguna utilidad para el lector. Debido a lo anterior, seleccionaremos tres de las principales afecciones, dos de ellas bacterianas (enfermedad bacteriana del riñón y piscirickettsiosis) y una viral (necrosis pancreática infecciosa), con el objeto de ser tratadas, en números consecutivos de esta publicación, con un nivel de profundidad intermedio. El objetivo es que esta información sirva ya sea de punto de partida a nuestros colegas que no sean especialistas en patología de peces pero que deseen posteriormente ahondar en estos temas, o bien que permita ilustrar a aquellos que tengan la curiosidad de revisar este artículo como cultura general para enriquecer sus conocimientos de patología veterinaria comparada, en un área que tradicionalmente no se enseñaba en la formación del médico veterinario en las universidades chilenas.

[Enfermedad bacteriana del Riñón]

Definición

La enfermedad bacteriana del riñón es una patología infecto-contagiosa, usualmente de carácter crónica, cuyo agente causal es una bacteria Gram positiva denominada *Renibacterium salmoninarum*. Los brotes naturales se presentan en forma exclusiva en peces salmonídeos y dentro de éstos, las especies provenientes de la cuenca del océano Pacífico (género *Oncorhynchus*) son las más susceptibles. La enfermedad es clínicamente insidiosa y afecta con mayor frecuencia al riñón, donde ocasiona lesiones de tipo granulomatosas, necróticas y abcedativas.

Historia

La enfermedad bacteriana del riñón (BKD) se describió por primera vez en el Reino Unido en 1930. En esa primera oportunidad, la enfermedad se denominó «Dee disease» y se presentó en salmónes del Atlántico (*Salmo salar*) capturados en los ríos Dee y Spey, ambos localizados en Escocia (Mackie et al. , 1933). Pocos años después, esta patología fue reportada en diferentes especies de trucha en un «hatchery» del Estado de Massachussets en los Estados Unidos de Norteamérica (Belding y Merrill, 1935). Evidencias posteriores demostraron la presencia de BKD en otras especies salmonídeas como el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmón coho (*O. kisutch*) y salmón sockeye (*O. nerka*) (Rucker et al. , 1951; Rucker et al. , 1953). Actualmente, la distribución geográfica de la enfermedad es muy amplia y se ha descrito prácticamente en todos los lugares donde existen poblaciones de peces salmonídeos, incluyendo a países de Europa (Alemania, Escocia, España, Francia, Inglaterra, Islandia, Italia, Reino Unido, Suecia y Yugoslavia) Canadá, Estados Unidos, Japón y Chile.

Inicialmente, el agente causal se le clasificó como perteneciente al género *Corynebacterium* en función de sus características morfológicas y de tinción a la observación microscópica. Debido a las notables exigencias para su desarrollo in vitro, los numerosos intentos por recuperar el agente causal, fueron infructuosos hasta 1950. Finalmente, en ese año, Earp en su trabajo de tesis con el Profesor E. J. Ordall en la University of Washington, logró por primera vez aislar esta bacteria usando una modificación del medio Dorset. Los mismos investigadores lograron completar posteriormente los postulados de Koch (Ordall y Earp, 1956). Los trabajos desarrollados posteriormente en el Departamento de Microbiología de la Oregon State University, dirigidos por el Profesor J. L. Fryer, fueron cruciales para la caracterización del agente patógeno y permitieron clasificar la bacteria en un nuevo género y especie, según se acepta hasta el día de hoy (Sanders y Fryer, 1980; Fryer y Sanders, 1981; Sanders y Fryer, 1986).

[Agente etiológico]

Este microorganismo es un bacilo corto (0,31, 5 por 0,1-1, 0 µm) tiñe marcadamente

Gram positivo (Figura 1) y no es ácido-alcohol resistente. Es inmóvil, no es encapsulado y tampoco esporula. Se presenta a menudo en pares y a veces se observa en cadenas cortas.

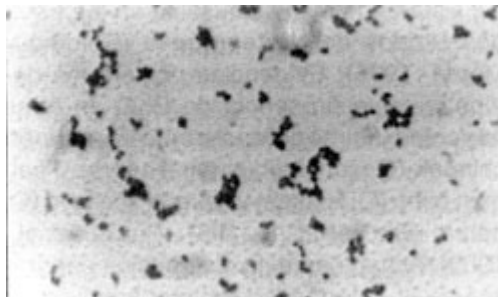


Fig.1. Tinción de Gram de *Renibacterium salmoninarum*. Se observan bacilos cortos Gram positivos en forma individual, en diplos y en agrupaciones corynebacteriformes.

Con relación a sus características de cultivo, se puede afirmar que es una bacteria exigente y «fastidiosa». Los medios de cultivo deben ser enriquecidos y suplementados con L-cisteína (0, 1% p/v). Medios tradicionales como agar sangre o Muller-Hinton suplementados con L-cisteína pueden ser empleados, pero no es lo ideal. Mejores rendimientos se obtienen con el medio desarrollado por Evelyn (1977), denominado «kidney disease medium 2» (KDM-2). Este último contiene además de L-cisteína, suero fetal bovino, triptona y extracto de levadura. El KDM-2 es el medio más usado actualmente, aunque también existen otras opciones como el SKDM-2, medio selectivo desarrollado por Austin (1983) el cual incorpora una serie de antimicrobianos al agar (cicloheximida, cicloserina, ácido oxolínico y polimixina B). El uso de estos antimicrobianos disminuye la aparición de otros microorganismos de crecimiento más acelerado que enmascaran el desarrollo de *R. salmoninarum*. Sin embargo, dependiendo de la cepa, también pueden inhibir su propio crecimiento. Algunos autores han descrito que el efecto del suero fetal bovino es principalmente detoxificante y que éste se puede reemplazar, sin perderse mayor eficiencia, por carbón activado en concentración de 0, 1 %, (produciendo un medio denominado KDMC), lo cual disminuye el costo del medio de cultivo (Daly y Stevenson, 1985).

R. salmoninarum es una bacteria «fastidiosa» en cuanto a su desarrollo in vitro demorando entre 2 a 3 semanas a lo menos, en cultivos primarios, para producir colonias visibles macroscópicamente (Sanders y Fryer, 1980). Se ha descrito como tiempo máximo para desarrollar colonias hasta 8 y 12 semanas de incubación en KDM-2 y SKDM-2, respectivamente. La temperatura de incubación óptima es de 15 °C, crece muy lentamente a 5 °C y 22 °C y no se desarrolla a 37 °C (Fryer, 1989). En KDM-2, las colonias se observan con un color que va desde el blanco hasta el de un tono cremoso amarillento; son de forma circular y de superficie convexa. Éstas son de tamaño pequeño, pero variable desde puntiformes hasta unos 2 mm de diámetro. Las colonias son brillantes, lisas, de bordes definidos y no producen endo ni exopigmentos (Figura 2).

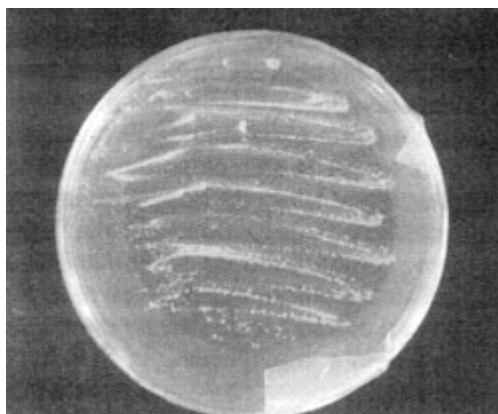


Fig. 2. Colonias de *Renibacterium salmoninarum* aisladas en medio KDM-2

Entre las propiedades bioquímicas de la bacteria, destaca su actividad proteolítica lenta y la producción de catalasa. Estructuralmente hablando, los polisacáridos de la pared celular son muy característicos de esta especie y están covalentemente unidos al péptidoglicano, su azúcar principal es la galactosa y además, contienen pequeñas cantidades de ramnosa, n-acetilglucosamina y nacetilfucosamina. El péptidoglicano contiene ácido glutámico, alanina, glicina y lisina como diamino ácido (Sanders y Fryer, 1980; Fiedler y Draxl, 1986). El porcentaje molar de guanina más citosina del DNA es de 55% (Banner et al. , 1991).

Serológicamente, usando anticuerpos policlonales, las cepas son muy homogéneas, aunque se puede encontrar diferencias leves entre algunas de ellas usando anticuerpos monoclonales.

La enfermedad clínica se presenta en todas las especies de peces de la subfamilia Salmoninae siendo más susceptibles las del género *Oncorhynchus*, es decir los denominados salmones del Pacífico. Existe abundante evidencia científica que permite considerar al BKD como una enfermedad específica de los peces salmonídeos, aunque existen rarísimos hallazgos de la presencia de la bacteria, pero no de la enfermedad, en otro tipo de peces cuando han estado cohabitando con salmones infectados.

La enfermedad se presenta en peces silvestres y de cultivo, tanto en agua dulce como en ambiente marino.

Este microorganismo se considera un patógeno obligado. Persiste en el ambiente en peces clínicamente enfermos y especialmente en portadores asintomáticos. La bacteria subsiste sólo por un período de tiempo limitado en el agua fuera del pez. En condiciones in vitro, se ha observado que una población de esta bacteria permanece viable hasta los 28 días en agua dulce filtrada para luego decaer bruscamente (Austin y Rayment, 1985). En otro trabajo, se observó que algunas bacterias persistían viables hasta el día 2, 7, 12 y 16 cuando se incubaban a 15 °C suspendidas en solución salina (0, 9%), agua dulce blanda, agua de mar y en agua dulce dura, respectivamente (Evelyn, 1993). Estos resultados indican que *R. salmoninarum* tiene el potencial de sobrevivir por algún tiempo en el agua fuera del hospedero, pero es probable que en condiciones naturales no sea capaz de competir exitosamente con otros microorganismos presentes en ese medio y en definitiva, pierda su viabilidad rápidamente.

[Modo de transmisión]

La transmisión es tanto de tipo horizontal como vertical.

Horizontalmente, se transmite a través del agua y por el consumo de restos de peces infectados. La infección a través del agua ha sido demostrada usando experimentos de cohabitación con peces infectados, tanto en condiciones de agua dulce (Bell et al., 1984) como salada (Murray et al., 1992). Es interesante señalar que en estos experimentos de transmisión horizontal, los peces demoran largo tiempo en enfermarse (50% de mortalidad a los 145 días), congruentemente con la condición crónica que presenta esta enfermedad. Es posible que en la transmisión a través del agua contribuya la contaminación fecal por parte de los peces infectados (ruta «oro-fecal»). Así, se ha observado que en salmones coho que se les administró heces de peces enfermos, mediante intubación, aumentaron sus tasas de mortalidad por BKD respecto a animales controles (Balfry et al., 1996). La transmisión horizontal también se ha descrito en condiciones de campo donde peces silvestres contagiaron a truchas cultivadas en un «hatchery» (Mitchum y Sherman, 1981).

En cuanto a la transmisión a la progenie, ésta se produce principalmente mediante una contaminación intraova que resiste la desinfección externa de estos gametos. En esta forma de transmisión, las hembras juegan un papel muy importante y no así los machos, donde incluso grandes cantidades de estas bacterias incorporadas al semen difícilmente producen la infección de las ovas (Evelyn et al., 1986b). Se sabe que las ovas pueden portar la bacteria tanto en su superficie como en el interior. El problema principal es que *R. salmoninarum* puede localizarse en el vitelo de la ova, quedando fuera del alcance de los desinfectantes y por lo tanto, complicando de sobremanera el control de la enfermedad (Evelyn et al., 1986b). La ova se puede infectar dentro del ovario previo a la ovulación, pero lo hace especialmente después de ocurrir este proceso, al ponerse las ovas en contacto con el fluido celómico infectado. Evelyn (1993) ha postulado que el ingreso de *R. salmoninarum* a las ovas sería a través del micropilo. Esta estructura consiste en una abertura de la cubierta externa de la ova, ubicada en una depresión crateriforme, por donde ingresa el espermatozoide durante el proceso de la fertilización. El hecho de que *R. salmoninarum* no produzca toxinas de efecto agudo puede ser importante, ya que las ovas infectadas sobreviven y de este modo, la transmisión de este microorganismo a la progenie es más probable. Cabe destacar que *R. salmoninarum* es la primera y única bacteria en peces salmonídeos en que se ha demostrado consistentemente la capacidad de transmitirse dentro de gametos fertilizados. Sin embargo, evidencias crecientes sugieren que otros microorganismos, como *Flavobacterium psychrophilum* (Ekman et al., 1999) y *Piscirickettsia salmonis* (Larenas et al., 1999) también emplean este método de infección.

[Patogenia]

Respecto de las rutas de ingreso que emplea *R. salmoninarum* para acceder a los tejidos internos de los peces, se cree que son través de las branquias y por la vía gastrointestinal, además de la infección de las ovas que es muy importante como ya se discutió previamente (Smith, 2000). Se estima que este microorganismo puede ingresar a través del epitelio branquial, debido a que los peces adquieren infecciones sistémicas con esta bacteria luego de bañarlos con suspensiones de *R. salmoninarum*. Así mismo, los salmones adquieren fácilmente la enfermedad si son alimentados con materiales infectados con esta bacteria (Smith, 2000).

Una vez que *R. salmoninarum* supera las barreras superficiales, la diseminación de ella ocurre a través de la circulación sanguínea en forma libre y también incorporada dentro de fagocitos, principalmente monocitos. La capacidad de estas bacterias para resistir las actividades séricas y fagocíticas que se presentan en la circulación sanguínea, como parte de los mecanismos defensivos de los peces, son características importantes para el éxito en esta etapa de diseminación del proceso infeccioso. A este respecto, se sabe que *R. salmoninarum* sobrevive in vivo y se multiplica dentro de fagocitos. Las características únicas de su pared celular pueden contribuir a su resistencia a la acción fagocítica. La proteína de superficie p57 también puede cumplir

un papel en este aspecto, ya que es un potente inhibidor de la «explosión respiratoria» que tiene lugar en los fagolisosomas de los macrófagos. En este mismo sentido, al estudiar las infecciones intracelulares de *R. salmoninarum*, se ha observado que muchas de estas bacterias son capaces de escapar del fagosoma previo a la formación del fagolisosoma, para entonces localizarse en el citoplasma de los fagocitos y de este modo, evaden la acción bacteriolítica que tiene lugar en el fagolisosoma Gutenberg et al., (1997) Como se ha comentado anteriormente, *R. salmoninarum* ocasiona generalmente un cuadro clínico crónico, lo cual es consistente con el hecho de que no se han detectado toxinas de efecto letal agudo en esta bacteria. Sin embargo, produce la proteína p57, una proteasa de 100kDa y un factor dermonecrótico de función poco conocida. La proteína p57 parece ser un factor de virulencia importante, ya que suprime la producción de anticuerpos in vitro y, además parece inducir una tolerancia inmunológica in vivo. Recientemente, se ha descrito una cepa de *R. salmoninarum* con bajos niveles de la proteína p57 en su superficie, denominada MT239. Al efectuarse infecciones experimentales en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón chinook, se demostró que esta cepa tiene una baja virulencia en comparación con otras que expresan concentraciones mayores de dicho antígeno (O' Farrel et al., 1999). Existen evidencias que indican que el daño renal en los peces infectados con *R. salmoninarum* tendría una causa inmunopatológica y sería originado por complejos inmunes, básicamente formados por anticuerpos ligados a la proteína p57, que ocasionarían glomerulonefritis en los animales con BKD (Sami et al., 1992; Flano et al., 1996; Kaattari y Piganelli, 1997; Kaattari, 2000).

[Signos clínicos y patológicos]

Cuando se presenta un brote de BKD, algunos peces infectados se observan aparentemente normales, mientras que otros manifiestan clínicamente la enfermedad. Esta afección puede presentarse en agua dulce y/o en el mar, pero generalmente no se expresa en peces de muy corta edad, dado que rara vez tiene un curso agudo. Los peces enfermos demuestran letargia y pérdida del apetito. Externamente, los peces pueden presentar las siguientes alteraciones: oscurecimiento de la piel especialmente de la zona dorsal (Figura 3), exoftalmia, distensión abdominal, petequias en la base de las aletas pectorales, formaciones vesiculares con contenido sanguinolento (especialmente en reproductores) y/o úlceras en la piel (Evelyn et al., 1998). Internamente, es probable que se aprecien, con diferentes grados de intensidad, las siguientes alteraciones morfológicas: branquias pálidas, nódulos grisáceos-blanquecinos de tamaño variable en el riñón, que también pueden observarse en hígado y bazo y en casos extremos eventualmente en cualquier órgano, aumento de volumen de riñón y bazo, presencia de fluido serosanguinolento u opaco en la cavidad visceral, focos hemorrágicos en hígado, intestino, grasa pilórica y musculatura y formación de cavidades en tejido muscular esquelético y de una pseudomembrana que puede cubrir distintos órganos de la cavidad celómica, especialmente sobre el bazo y el corazón (Evelyn et al., 1998). Respecto a la formación de esta pseudomembrana, se ha observado ya desde hace décadas que se presenta con frecuencia cuando las temperaturas del agua, en que se han encontrado los peces moribundos, son menores a 9° C, en tanto que esta lesión prácticamente no se manifiesta con temperaturas superiores a la antes mencionada (Smith, 1964).



Fig. 3. Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectada experimentalmente con *renibacterium salmoninarum*. Notese el oscurecimiento de la piel del dorso respecto al pez control proveniente del mismo lote.

La principal lesión histopatológica corresponde a una respuesta granulomatosa crónica proliferativa que afecta principalmente a los tejidos hematopoiéticos. Los granulomas tienen tamaños muy diversos y contienen una zona central caseificada rodeada por células epitelioides y una infiltración de células linfoides. Las lesiones en los glomérulos y túbulos renales son histológicamente similares a las observadas en las glomerulonefritis y en síndromes nefráticos en animales mamíferos (Young y Chapman, 1978). La grasa pancreática puede estar profusamente colonizada por *R. salmoninarum* y algunas bacterias se localizan en la muscularis externa de los ciegos pilóricos, siendo acompañadas por una subsecuente infiltración leucocitaria. En el intestino y alrededor de la vejiga natatoria, se acumulan depósitos de fibrina y colágeno asociados con un grado moderado de hipertrofia y la presencia de numerosas células fagocíticas que contienen estas bacterias. En algunos casos, se observa una epicarditis con una pseudomembrana diftérica envolviendo al corazón. Esta pseudomembrana, que como se mencionó puede cubrir distintos órganos, se compone de delgadas capas de fibrina y fibras colágenas (Bruno, 1986).

Diagnóstico

El diagnóstico se debe iniciar en casi todos los casos mediante la obtención y análisis de los antecedentes anamnésticos, seguido de la observación de los signos y síntomas clínicos y de la patología macroscópica de los peces. En nuestra opinión, un veterinario especializado en patología de peces, en la mayoría de los brotes de BKD conseguirá un diagnóstico presuntivo bastante certero después de examinar los peces. Sin embargo, el apoyo de laboratorio para observar las lesiones en los tejidos y confirmar la presencia de la bacteria es altamente recomendable, en especial si los animales se encuentran en una condición subclínica.

Las tinciones de Gram y PAS desde frotis o cortes de tejidos con lesiones son muy útiles, en especial la primera, para complementar el diagnóstico, en conjunto con el análisis histopatológico y la identificación mediante pruebas serológicas de la bacteria. Cuando hay consistencia en los resultados de los exámenes recién mencionados, se considera suficiente evidencia como para dar por confirmado el diagnóstico presuntivo de la enfermedad.

Sin perjuicio de lo anteriormente señalado, indudablemente el aislamiento e identificación posterior de la bacteria es la prueba más certera de la presencia del microorganismo y además nos demuestra que éste se encontraba viable, por lo tanto cada vez que sea posible debiera intentar realizarse. No obstante lo anterior, dado lo difícil y lento del aislamiento de esta bacteria, en la práctica no es posible usarlo en forma rutinaria por lo cual se han desarrollado una serie de pruebas serológicas y también de sondas

moleculares para una detección más rápida de *R. salmoninarum* en los tejidos de los peces.

Las pruebas serológicas más ampliamente usadas son las de inmunofluorescencia y las de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), aunque se han desarrollado otras técnicas como la de inmunodifusión, la coaglutinación con proteína Ade *Staphylococcus*, «dot blot» y más recientemente, pruebas de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (Sakai et al., 1987; Fryer, 1989; Brown et al., 1994; Pascho et al., 1998). Las pruebas de inmunofluorescencia directa e indirecta (Bullock et al., 1980; Laidler, 1980) son las que más se utilizan para detectar la bacteria en los tejidos de los peces en el diagnóstico de la enfermedad (Figura 4).

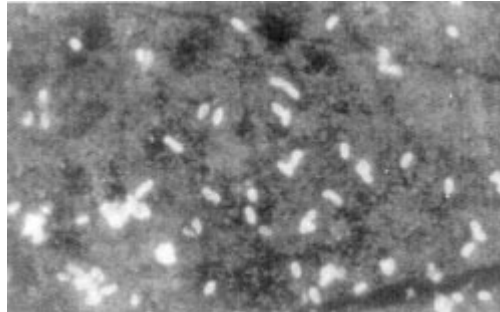


Fig. 4. Inmunofluorescencia indirecta de un frotis desde un cultivo de *Renibacterium salmoninarum*.

Sin embargo, cuando el propósito es efectuar un «screening» de peces, especialmente de «smolts» o reproductores, las pruebas de ELISA se emplean tanto o más que las de inmunofluorescencia. Las pruebas de ELISA para *R. salmoninarum* están diseñadas para detectar antígenos solubles que se extraen de los tejidos supuestamente infectados y existen básicamente dos clases de ellas. Una de éstas emplea anticuerpos policlonales que reaccionan con determinantes antigénicos estables a temperaturas elevadas (Pascho y Mulcahy, 1987) y las otras, utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína termolábil p57 (Wiens y Kaattari, 1989; Rockey et al., 1991). Las pruebas de ELISA con los anticuerpos monoclonales han probado ser muy específicas, pero las muestras deben mantenerse refrigeradas o congeladas luego de su obtención. Aunque un problema de importancia en las pruebas de ELISA es la dificultad para conseguir un número representativo de peces negativos para establecer las densidades ópticas basales «normales» de una población determinada de peces, se ha propuesto un mecanismo para establecer adecuadamente los «valores de corte» para la interpretación de los resultados (Meyers et al., 1993). En general, se estima que las pruebas de ELISA son más sensibles que las de inmunofluorescencia, sin embargo, Elliot y Barila (1987) desarrollaron una técnica de filtración en membranas (MF-FAT) para mejorar la detección de *R. salmoninarum* en fluido celómico mediante inmunofluorescencia. Esta última prueba resultó ser altamente sensible, mejorando la sensibilidad en 100 veces respecto de las inmunofluorescencias convencionales (Elliot y McKibben, 1997; Evelyn, 1998), considerándose incluso mejor que los ensayos de ELISA. Por su parte, la prueba de PCR se ha descrito como sensible y específica (Brown et al., 1994), pero no se usa aún en forma rutinaria. Al respecto Pascho et al. (1998) haciendo un análisis comparativo, detectaron un 100% de positividad en muestras de fluido ovárico de salmón chinook al emplear una prueba de «nested PCR» y un 64% y 39% con MF-FAT y ELISA respectivamente, lo que indicaría una mayor sensibilidad del PCR usado con respecto a las otras técnicas. Según estos autores, a menos que se pueda cuantificar, el uso de PCR no sería apropiado para los programas regulares de control del BKD a menos que se esté en condiciones de obtener una eliminación completa del patógeno. En otra comparación entre pruebas diagnósticas, también se observaron discrepancias, aunque en sentido contrario, detectándose que algunas muestras positivas débiles con ELISA

resultaban negativas a PCR, al aplicarse en muestras de salmónes chinook moribundos (Evelyn et al., 1998).

[Diagnóstico diferencial]

Se debe diferenciar de otros bacilos Gram positivos especialmente *Carnobacterium piscicola*, *Lactococcus piscium* y *Vagococcus salmoninarum*. Estas tres especies tienen gran similitud entre sus patrones bioquímicos, originalmente se les clasificó como lactobacilos y se les asoció como agentes causales de la «pseudoenfermedad del riñón». Son básicamente bacterias oportunistas y tienen una baja virulencia.

En relación a las lesiones nodulares granulomatosas, se debe tener en cuenta que este tipo de alteraciones pueden ser generadas por otros microorganismos, ya sean bacterianos (*Mycobacterium* spp, *Nocardia* spp), micóticos (*Ichthyophonus hoferi*, *Exophiala salmonis*) o parasitarios (Enfermedad Proliferativa del Riñón, *Ceratomyxa shasta*, metazoos enquistados) e incluso como reacción a materiales extraños particulados (Ej. componentes oleosos de los adyuvantes de las vacunas) en salmónes.

Por otra parte, en peces expuestos a niveles elevados de dióxido de carbono en el agua, se produce una deposición de sales cálcicas en los uréteres, lo que origina nefrocalcinosis o urolitiasis, donde se producen lesiones renales, que a nivel macroscópico podrían confundirse también con BKD.

[Tratamiento]

No existe un tratamiento medicamentoso que elimine completamente la bacteria del hospedero, sin embargo las mortalidades ocasionadas en un brote de la enfermedad pueden ser disminuidas significativamente empleando algunos antimicrobianos. La falta de la eficiencia terapéutica de los quimioterápicos se atribuye a la naturaleza intracelular del patógeno donde la bacteria queda fuera del alcance de éstos (Fryer y Sanders, 1981) En un principio se emplearon diferentes sulfas y antibióticos, hasta los trabajos de Wolf y Dunbar (1959) en que luego de probar 34 antimicrobianos, establecieron que el tratamiento óptimo consistía en administrar 100mg de eritromicina por kg de pez, a través del alimento, durante 21 días. Desde ese entonces, éste ha sido considerado como el tratamiento de elección para esta enfermedad. Sin embargo, tanto en el caso de las sulfas como en el de la eritromicina, no es raro que se requiera una repetición del tratamiento oral para controlar el BKD (Moffit y Schreck, 1988), a pesar de que los niveles de la eritromicina alcanzados en los tejidos son varias veces superiores a las concentraciones mínimas bactericidas (0,3µg/mL) estimadas in vitro (Evelyn, 1986). Más recientemente, Austin (1985) evaluó una gran variedad de antimicrobianos para el tratamiento del BKD, concluyendo que las drogas de elección serían además de la eritromicina (fosfato y tiocianato), la clindamicina, la espiramicina y la penicilina sódica. Un aspecto interesante de considerar de este trabajo de Austin, es que el tratamiento oral por 10 días resultó casi tan eficiente como el clásico de 21. Sería importante si este hecho se estableciera firmemente, por cuanto se podrían disminuir los costos de los tratamientos y además, evitar el riesgo de producir daño de la función renal en los peces sometidos a estos tratamientos tan prolongados (Hicks y Geraci, 1984).

[Prevención]

Debido a las dificultades con los tratamientos, la mejor manera de enfrentar esta enfermedad es mediante la implantación de diversas medidas preventivas.

Respecto de las estrategias para evitar la transmisión horizontal, como una acción previa a la instalación de la piscicultura, idealmente se debería conseguir una fuente de

agua, ya sea de vertiente o de un afluente donde no existan poblaciones silvestres de especies salmonídeas. En este mismo sentido, se debería tratar de evitar el empleo de aguas cuando existen otras pisciculturas cercanas, en especial las de curso arriba de los afluentes del posible lugar de cultivo. Por otra parte, es importante considerar las medidas sanitarias de desinfección y otras para evitar la diseminación de la bacteria dentro de una piscicultura. Además es muy recomendable tener especímenes de una sola generación y efectuar períodos de descanso y desinfección de las instalaciones.

Aunque, como ya se ha discutido, la bacteria puede localizarse dentro de las ovas, también estos microorganismos contaminan la superficie de estos gametos, aumentando por ese mecanismo las probabilidades de infectar a la progenie. Por este motivo, y también para disminuir infecciones con otros patógenos, siempre se debería desinfectar las ovas antes de ingresarlas al «hatchery» para lo cual se aconseja exponerlas a una solución yodada (100ppm) durante 15 minutos (Fryer, 1989). Una medida muy recomendable es conseguir que los especímenes con que se inicia un ciclo de crianza, ya sean de ovas para la etapa de agua dulce o de «smolts» en la fase marina, deriven de reproductores que hayan sido apropiadamente examinados y resultado libres de la infección por esta bacteria. Como se explicó anteriormente, para la transmisión vertical de esta enfermedad lo importante es controlar si las hembras están infectadas (Evelyn, 1986). Los procesos de «screening» de las hembras reproductoras deben ser idealmente rápidos, específicos y sensibles. Los métodos más empleados son pruebas de inmunofluorescencia, directa o indirecta (Bullock et al., 1980; Laidler, 1980) y de ELISA, con el propósito de detectar la presencia de la bacteria desde tejido renal o de fluido celómico (Pascho y Mulcahy, 1987; Lee y Evelyn, 1989). Una medida que disminuye drásticamente la transmisión vertical es la inyección de las hembras reproductoras con eritromicina. Normalmente, se ha aceptado que las inyecciones deberían practicarse entre 30 a 56 días previos al desove para que la acumulación del antibiótico sea la adecuada (Evelyn et al., 1986a). Sin embargo, otros autores han descrito que mediante inyecciones aplicadas a sólo 9 días previos al desove también se consigue el efecto deseado (Armstrong et al., 1989). Otro tratamiento de tipo estratégico, no terapéutico, aunque no tan empleado como la inyección de los reproductores, consiste en administrar eritromicina por el alimento a los alevines, corto tiempo después que éstos inician su primera alimentación. Esta medida persigue disminuir la tasa de infección a un mínimo, con un bajo costo debido al menor volumen de antibiótico usado por cada pez (Evelyn, 1993).

Debido a las deficiencias en la efectividad de los tratamientos contra esta enfermedad, sería de gran utilidad contar con vacunas efectivas para la prevención del BKD. A pesar de los avances que han existido en esta materia y que algunos laboratorios actualmente afirman haber desarrollado vacunas contra esta bacteria, no existe aún una vacuna con una documentación consistente de su valor inmunoprotectivo como para recomendar su uso como medida inmunoproláctica habitual. Sobre esta materia, existe abundante información en la literatura. Diferentes preparados vaccinales generan anticuerpos en los peces, pero no se relacionan con inmunoprotección contra la enfermedad (Evelyn, 1993) e incluso, los anticuerpos pueden generar complejos inmunes los cuales se asocian con la glomerulonefritis que se produce en el BKD (Kaattari, 2000). Lo anterior, además de su característica de multiplicarse frecuentemente en forma intracelular, sugiere que la inducción de inmunidad celular puede ser fundamental en la acción profiláctica.

Una de las dificultades principales para generar preparados inmunoprolácticos las ocasiona probablemente las grandes cantidades de proteína p57 que se encuentran en la pared de la bacteria y que también son exportadas al medio, que ocasionan inmunodepresión y forman los complejos inmunes antes mencionados. Una interesante línea de trabajo en el desarrollo de vacunas contra BKD consiste en investigaciones que se han orientado a, eliminar la proteína p57, lo cual se hace mediante la acción de una proteasa serina que específicamente digiere esta proteína. Esta enzima libera la misma bacteria y se activa a 37 °C, por lo cual se puede fácilmente eliminar la proteína p57 (Piganelli et al., 1999a). De esta manera, se han preparado antígenos sin la

proteína p57 los que se han administrado por inyección y también oralmente (estas últimas protegidas entéricamente mediante un vehículo). Los resultados en cierto modo han sido sorprendentes, ya que la aplicación por inyección produjo altos títulos de anticuerpos, pero los peces murieron más aceleradamente que los controles luego de ser desafiados apropiadamente. Sin embargo, la administración oral produjo una completa protección de los peces contra la bacteria, lo cual indica que no sólo es importante eliminar la proteína p57, sino que también parece ser fundamental que la vacuna sea aplicada por esta última vía para generar una respuesta inmune efectiva (Piganelli et al., 1999 b; Kaattari, 2000).

[Situación del BKD en Chile]

En términos históricos, es razonable especular que es muy probable que esta bacteria haya ingresado a nuestro país en conjunto con las primeras introducciones de especies salmonídeas alrededor de un siglo atrás, lo cual se fue posiblemente incrementando con las importaciones masivas de ovas que han ocurrido desde inicios de la década de 1970 hasta el día de hoy.

Los primeros registros de BKD en Chile que hemos recabado provienen de un informe de circulación restringida elaborado por Shimazu y Puchi (1984), en el cual se describe la presencia de la enfermedad en salmónidos de la XI Región sobre la base de signos clínicos y lesiones macroscópicas. La enfermedad se observó por primera vez en febrero de 1983 y durante ese año afectó severamente a salmones de las especies *Oncorhynchus keta* y *O. gorbuscha* y en menor grado a salmones coho, chinook, sakura (*O. masou*) y trucha arco iris.

Sin embargo, la primera publicación científica sobre BKD en Chile y en donde se comunicó la identificación específica de la presencia de *R. salmoninarum* en peces salmonídeos, mediante pruebas de inmunofluorescencia, la realizaron Sanders y Barros el año 1986. Finalmente, el primer aislamiento registrado en nuestro país de *R. salmoninarum* lo efectuaron investigadores del grupo de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile (Enríquez et al., 1988).

Es interesante señalar que hasta finales de la década de 1980, el BKD se consideraba por lejos la principal enfermedad que afectaba a los salmones en Chile y en la práctica monopolizaba la preocupación tanto de productores como de los médicos veterinarios encargados de la salud de los peces cultivados. En algunos casos, las pérdidas por mortalidades atribuidas a BKD llegaban al 50% en salmón coho (Lindbergh, 1993) y éstas eran incluso superiores en otras especies de salmones del Pacífico (Shimazu y Puchi, 1984). Esta situación sólo vino a ser modificada con la brusca irrupción de una nueva condición patológica en los primeros meses del año 1989, desconocida hasta ese entonces en el mundo, que hoy la conocemos como piscirickettsiosis y la cual es causada por una rickettsia acuática, actualmente denominada *Piscirickettsia salmonis* (Fryer et al., 1990; Garcés et al., 1991; Fryer et al., 1992).

Las escasas descripciones de la presencia de BKD en nuestro país, se refieren a casos de las regiones X, XI y XII, donde se ha concentrado la mayor producción de salmones en Chile, y tradicionalmente ha existido la creencia de que la zona central del país estaría libre de esta afección. Sin embargo, en informaciones no publicadas, en exámenes efectuados en nuestro laboratorio, desde 1990 en adelante hemos detectado frecuentemente truchas arco iris portadoras de la bacteria provenientes de diferentes pisciculturas de la Zona Central del país, particularmente de las regiones V y Metropolitana. En la mayoría de las veces, estos hallazgos se han encontrado en peces clínicamente sanos y los cuales exhiben bajos niveles de infección. Hace una excepción de lo anterior, un caso en se presentó un brote con mortalidades importantes y con una gran cantidad de microorganismos en el tejido renal de esos últimos especímenes.

Desde una óptica global, las mortalidades atribuidas a BKD disminuyeron en forma

ostensible en la década de los 90 lo que se relaciona con mejoras en el manejo sanitario especialmente en el reproductivo. Actualmente, en Chile, la mayoría de las empresas salmoneras aplican inyecciones de antibióticos en las reproductoras previo al desove y efectúan un «screening» eliminando las ovas de aquellas hembras que resultan positivas a *R. salmoninarum*. Es posible que el intensivo uso de antibióticos empleados para el control de la piscirickettsiosis en los últimos 12 años haya también contribuido a disminuir la carga de *R. salmoninarum* en los peces.

Un aspecto interesante de tener en consideración es que posiblemente debido al efecto inmunosupresor que se le atribuye a *R. salmoninarum*, esta bacteria puede estar actuando en nuestro medio favoreciendo la presentación de otras enfermedades mediante infecciones concomitantes con otros patógenos. Al respecto, Larenas (1999), realizó infecciones experimentales conjuntas con *R. salmoninarum* y *P. salmonis* demostrando un efecto aditivo en las mortalidades acumuladas comparado con infecciones únicas con cada patógeno. Cabe señalar que la presencia de ambos patógenos simultáneamente en peces es un hallazgo relativamente común en situaciones de terreno en Chile.

En resultados no publicados generados en nuestro laboratorio (Centro de Referencia de Diagnóstico de Enfermedades de Salmones), en un amplio esfuerzo de prospección sanitaria de los salmones cultivados en Chile realizado en conjunto con el Instituto Tecnológico del Salmón, encontramos, entre abril del 2000 hasta abril del 2001, un total de 56 centros que tenían salmónidos con algún grado de infección con *R. salmoninarum*. La bacteria se detectó en las tres especies, examinadas (salmón coho, salmón del Atlántico y trucha arco iris) y su distribución geográfica alcanza todas las zonas estudiadas tanto de la Décima como la Décimo primera Región. En cuanto al tipo de salinidad de las aguas la infección se detectó en peces mantenidos en agua dulce, estuarina y de mar. Estos resultados demuestran claramente que no obstante los avances realizados para el control de BKD en nuestro país, la infección en modo alguno se ha erradicado y la enfermedad se comporta en forma insidiosa, reapareciendo cada cierto tiempo y en algunos casos en forma bastante severa, especialmente cuando existen infecciones concomitantes. Al respecto cabe señalar que durante el año 2000 se presentaron brotes de BKD con mortalidades significativas en la XI y especialmente en la XII Región.

El control de los reproductores sin duda ha disminuido la transmisión vertical del patógeno y de hecho la prevalencia en éstos ha resultado bastante baja en los últimos años, con niveles de infección en la mayoría de los planteles inferiores al 5 % de las hembras examinadas. A nuestro juicio, la infección persiste en nuestro medio debido a dos fuentes principales. La primera de ellas es de la abundante fauna de peces salmonídeos que viven libremente en nuestras aguas y que pueden portar la bacteria y transmitirla a las poblaciones de peces cultivados. La segunda fuente se refiere a una pequeña proporción de peces, que a pesar de las medidas de control de los reproductores, adquieren la bacteria en forma vertical, y que posteriormente amplifican significativamente la infección en la biomasa de peces transmitiéndola en forma horizontal a lo largo de su vida productiva.

En síntesis, se ha disminuido el impacto económico originado por BKD en nuestro país comparados con los que se presentaron en la década de 1980, probablemente debido a los importantes avances en las capacidades de diagnóstico y de manejo sanitario, sin embargo la enfermedad sigue y continuará siendo importante ya que la infección no parece ser posible de erradicar, a juicio de los autores de este artículo, debido principalmente a las abundantes poblaciones de peces salmonídeos de vida libre en nuestros ecosistemas acuáticos.

Tabla N° 1

Detección de *Renibacterium salmoninarum* en peces salmonídeos de centros de cultivo de las Regiones X y XI de Chile.

	Centros positivos	Centros Negativos	Total centros examinados	% de centros positivos
X Región sitios de agua dulce	14	40	54	25,9%
X Región sitios de mar	37	55	92	40,2%
XI Región sitios de agua dulce	2	8	10	20,0%
XI Región sitios de agua de mar	3	13	16	18,7%
Total	56	116	172	32,5%

Monitoreo desde abril del 2000 hasta abril del 2001.
 Se examinaron aproximadamente 30 peces por centro en cada oportunidad.
 Las muestras examinadas corresponden a frotis de riñón las que se observaron mediante tinción de Gram e inmunofluorescencia.
 Se consideró positivo el centro que tenía al menos un pez con la presencia de la bacteria.
 Los sitios de mar incluye los estuarinos.

[Agradecimientos]

Debido a su indispensable contribución en diferentes etapas del proceso diagnóstico en la prospección de *R. salmoninarum* se agradece al Dr. Claudio Araya y a la Srta. Deborah Bustos del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y a los Dre(a)s Jorge Cassigoli, Oscar Troncoso, Diana Macias y Claudia González del Instituto Tecnológico del Salmón (INTESAL). Se agradece también al Dr. Sergio Contreras por la preparación del suero específico anti *R. salmoninarum* al Sr. Jaime Solorza por la obtención de las fotografías y al Dr. Raúl Castro y la Sra. Jessica Montagna por su valioso aporte de información sobre el tema.

✚ Este artículo fue financiado y producido en el marco del proyecto FONDECYT 1010544

[Bibliografía seleccionada]

Armstrong, R. D. , Evelyn, TP. T, Martin, S. W. , Dorward, W. , Ferguson, H. W. 1989. Erythromycin levels within eggs and alevins derived from spawning broodstock chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) injected with the drug. **Diseases of Aquatic Organisms 6:33-36.**

Austin, B. 1985. Evaluation of antimicrobial compounds for the control of bacterial kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Diseases 8:209-220.**

Austin, B. , Embley, T. M. , Goodfellow, M. 1983. Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*. **FEMS Microbiology Letters 17:111-114.**

Austin, B. , Rayment, J. 1985. Epizootiology of *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid

fish. **Journal of Fish Diseases 8:505-509.**

Balfry, S. K. , Albright, L. J. , Evelin, T P. T 1996. Horizontal transfer of *Renibacterium salmoninarum* among farmed salmonids via the fecal-oral route. **Diseases of Aquatic Organisms 25:63-69.**

Banner, C. R. , Rohovec, J. S. , Fryer, J. L. 1991. A new value for mol percent guanine cytosine of DNA for the salmonid pathogen *Renibacterium salmoninarum*. **FEMS Microbiology Letters 17:111-114.**

Belding, D. L. , Merrill, B. 1935. A preliminary report upon hatchery disease of the Salmonidae. **Transactions of the American Fisheries Society 65:76-84.**

Bell, G. R. , Higgs, D. A. , Traxler, G. S. 1984. The effect of dietary ascorbate, zinc, and manganese on the development of experimentally induced bacterial kidney disease in salmonids. **Journal of Fish Diseases 9:76-64.**

Brown, L. L. , Iwama, G. K. , Evelyn, T. P. T. , Nelson, W. S. , Levine, R. P. 1994. Use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect DNA from *Renibacterium salmoninarum* within individual salmonid eggs. **Diseases of Aquatic Organisms 18:165-171.**

Bruno, D. W. 1986. Histopathology of the bacterial kidney disease in laboratory infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases 9:523-537.**

Bullock, G. L. , Griffin, B. R. , Stuckey, H. M. 1980. Detection of *Corynebacterium salmonis* by direct fluorescent antibody test. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 3:719-721.**

Daly, J. G. and Stevenson, R. M. W. 1985. Charcoal Agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. **Applied Environmental Microbiology 50:868-871.**

Earp, B. J. 1950. Kidney disease in young salmon. **M. Sc. Theses. University of Washington. 150 p.**

Elliot, D. G. , Barila, T. Y. 1987. Membrane filtration-fluorescent antibody staining procedure for detecting and quantifying *Renibacterium salmoninarum* in coelomic fluid of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Canadian Journal of Aquatic Sciences 44: 206-210.**

Elliott, D. G. , McXibben, C. L. 1997. Comparison of two fluorescent antibody techniques (FATs) for detection and quantification of *Renibacterium salmoninarum* in coelomic fluid of spawning chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **Diseases of Aquatic Organisms 30:37-43.**

Ekman, E. , Holmgren, I. , Kerstin, W. 1999. The presence of *Flavobacterium psychrophilum* in the milt - a possible route of transmission?. **Abstract Book. 9th International Conference «Diseases of Fish and Shellfish». 19-24th. September 1999. Rhodes Hellas. 0140.**

Enríquez, R. , Schaffer, J. W. , Monras, M. , Silva, C. 1988. Primer aislamiento de *Renibacterium salmoninarum*, agente causal de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) de los salmónidos. **XII Congreso Chileno de Microbiología. Comunicación 10. Noviembre de 1988,**

Santiago, Chile.

Evelyn, T.P.T. 1977. An improved growth medium for the kidney disease bacterium and some notes on using the medium. **Bulletin of Office of International Epizootics 87:511-513.**

Evelyn, T.P.T. 1986. Persistence of the kidney disease bacterium, *Renibacterium salmoninarum*, in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), eggs treated during water hardening with povidone-iodine. **Journal of Fish Diseases 9:462-464.**

Evelyn, T.P.T. 1993. Bacterial Kidney Disease-BKD. p. 177-195. In: **Bacterial Diseases of Fish. Edited by Inglis V., Roberts, R. J. and Bromage, N. R. Blackwell Scientific Publications. London. 312 p.**

Evelyn, T.P.T., Ketcheson, J. E., Prosperi Porta, L. 1986a. Use of erythromycin as a means of preventing vertical transmission of *Renibacterium salmoninarum*. **Diseases of Aquatic Organisms 2:7-11.**

Evelyn, T. P. T., Prosperi-Porta, L., Ketcheson, J. E. 1986b. Experimental intraovum infection of salmonid eggs with *Renibacterium salmoninarum* and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite treatment with erythromycin. **Diseases of Aquatic Organisms 1:197-202.**

Evelyn, TP. T., Kent, M. L., Poppe, TT., Bustos, P. 1998. Bacterial Diseases. p. 17-35. In: **Diseases of Seawater Netpen-Reared Salmonid Fishes. Quadra Printers Ltd. Nanaimo. British Columbia. Canada. 138 P.**

Fiedler, F., Draxl, R. 1986. Biochemical and immunological properties of *Renibacterium salmoninarum*. **Journal of Bacteriology 168:799-804.**

Flano, E., Lopez-Fiero, P., Razquin, B., Kaattari, S. L., Villena, A. 1996. Histopathology of renal and splenic haemopoietic tissues of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. **Diseases of Aquatic Organisms 24:107115.**

Fryer, J. L. 1989. Ictiopatología. Enfermedades Bacterianas y Virales de los Peces Salmonídeos. **Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Escuela de Posgrado. 180p. Santiago, Chile.**

Fryer, J. L., Lannan, C. N., Garcés, L. H., Larenas, J. J., Smith, P. A. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. **Fish Pathology 25:107-104.**

Fryer, J. L., Lannan, C. N., Giovannoni, S. J., Wood, N. D. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. **International Journal of Systematic Bacteriology 42:120-126.**

Fryer, J. L., Sanders, J. E. 1981. Bacterial kidney disease of salmonid fish. **Annual Review of Microbiology 35:273-278.**

Garcés, L. H., Larenas, J. J., Smith, P. A., Sandino, S., Lannan, C. N., Fryer, J. L. 1991. Infectivity of a rickettsial isolated from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Diseases of Aquatic Organisms 11:93-97.**

1997. Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. **Diseases of Aquatic Organisms 28:93-106.**

Hicks, B. D. , Geraci, J. R. 1984. A histological assesment of damage in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, fed rations containing erythromycin. **Journal of Fish Diseases 7:457-465.**

Kaattari, S. , Piganelli, J. D. 1997. Immunization with bacterial antigen: Bacterial Kidney Disease. p. 145-152. **In: Fish Vaccinology. Editors: Gudding, A. , Lillehaug, A. , Mydtlyng, P. J. , Brown, F Karger, Basel. 484p.**

Kaattari, S. 2000. Bacterial Kidney Disease Vaccine Development and Immunity. **Libro de Resúmenes IV Jornadas de Salmonicultura- XI Congreso de Medicina Veterinaria. Puerto Varas, Chile. 25-27 de octubre. p. 72-74.**

Laidler, L. A. 1980. Detection and identification of the bacterial kidney disease (BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique. **Journal of Fish Diseases 3:67-69.**

Larenas, J. 1999. Evaluación experimental clínico patológica del efecto de la densidad poblacional, temperatura e infección concomitante con *Renibacterium salmoninarum* sobre la presentación de piscirickettsiosis. **Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 147p.**

Larenas, J. , Pérez, B. , Hidalgo, L. , Contreras, J. , Smith, P. 1999. Vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) under farming conditions. **Abstract Book. 9th International Conference «Diseases of Fish and Shellfish». 19-24th. September 1999. Rhodes Hellas. 0140.**

Lee, E. G. -H. , Evelyn, T. P. T. 1989. Effect of *Renibacterium salmoninarum* levels in ovarian fluid of spawning chinook salmon on the prevalence of the pathogen on their eggs and progeny. **Diseases of Aquatic Organisms 7:179-184.**

Lindbergh, J. 1993. The Distribution of Salmon Aquaculture. Chile. p. 53. **In: Salmon Aquaculture. Heen, K. , Monahan, R. L. , Utter, F. Fishing New Books. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 278p.**

Mackie, T. J. , Arkwright, J. A. , Pryce-Tannatt, T. E. , Mottram, J. C. 1933. **The Second Interim Report of the Furunculosis Committee. Edinburgh, H. M. S. O.**

Meyers, T. J. , Short, S. , Farrington, C. , Lipson, K. , Geiger, H. J. , Gates, R. 1993. Establishment of a negative-positive threshold optical density value for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum* in Alaska Pacific salmon. **Diseases of Aquatic Organisms 16:191-197.**

Mitchum, D. L. , Sherman, L. E. 1981. Transmission of bacterial kidney disease from wild to stocked hatchery trout. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 38:547-551.**

Moffit, C. M. , Schreck, J. A. 1988. Accumulation and depletion of orally

- administered erythromycin thiocyanate in tissues of chinook salmon. **Transactions of the American Fisheries Society** 117:394-400.
- Murray, C. B. , Evelyn, TP. T, Beacham, TD. , Banner, L. W. , Ketcheson, J. E. , Prospero, L. 1992. Experimental induction of bacterial kidney disease in chinook salmon by immersion and cohabitation challenges. **Diseases of Aquatic Organisms** 12:91-96.
- O'Farrell, C. L. , Elliot, D. , Strom, M. S. , Winton, J. R. , Landolt, M. L. In vitro and in vivo comparisons of virulent and attenuated *Renibacterium salmoninarum* strains. **Abstract Book. 9th International Conference «Diseases of Fish and Shellfish».** 19-24th. September 1999. Rhodes Hellas. 0140.
- Ordal, E. J. , Earp, B. J. 1956. Cultivation and transmission of etiological agent of kidney disease in salmonid fishes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** 92:85-88.
- Pascho, R. J. , Chase, D. , McKibben, C. L. 1998. Comparisons of the membranefiltration test, the enzyme-linked immunosorbent assay, and the polymerase chain reaction to detect *Renibacterium salmoninarum* in salmonid ovarian fluid. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation.** 10:60-66.
- Pascho, R. J. , Mulcahy, D. 1987. Enzymelinked immunosorbent assay for a soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of salmonid bacterial kidney disease. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 44:183-191.
- Piganelli, J. D. , Wiens, G. D. , Kaattari, S. L. 1999a. Elevated temperature treatment as a novel method for decreasing p57 on the cell surface of *Renibacterium salmoninarum*. **Diseases of Aquatic Organisms** 36:29-35.
- Piganelli, J. D. , Wiens, G. D. , Zhang, J. A. , Christensen, J. M. , Kaattari, S. L. 1999b. Evaluation of whole cell p57-vaccine against *Renibacterium salmoninarum*. **Diseases of Aquatic Organisms** 36:37-44.
- Rockey, D. D. , Gilkey, L. L. , Wiens, G. D. , Kaattary, S. L. 1991. Monoclonal antibodybased analysis of the *Renibacterium salmoninarum* p57 protein in spawning chinook and coho salmon. **Journa of Aquatic Animal Health** 3:23-30.
- Rucker, R. R. , Bernier, A. F. , Whipple, W. J. , Burrows, R. E. 1951. Sulfadiazine for kidney disease. **Progressive Fish Culturist** 13:135-137.
- Rucker, R. R. , Earp, B. J. , Ordal, E. J. 1953. Infectious disease of Pacific salmon. **Transactions of the American Fisheries Society** 83:297-312.
- Sakai, M. , Koyama, G. , Atsuta, S. , Kobayashi, M. 1987. Detection of *Renibacterium salmoninarum* by a modified peroxidase-antiperoxidase (PAP) procedure. **Fish Pathology** 22:1-5.
- Sami, S. , Fischer-Scherl, T. , Hoffman, R. W. , Pfeil-Putzien, C. 1992. Immune complexmediated glomerulonephritis associated with bacterial kidney disease in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Pathology** 29:169-174.

antibody test for the occurrence of *Renibacterium salmoninarum* among salmonid fish in Chile. **Journal of Wildlife Diseases** **22:255-257**.

Sanders, J. E. , Fryer, J. L. 1980. *Renibacterium salmoninarum* gen. nov. sp. nov. , The causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fish. **International Journal of Systematic Microbiology** **30:496-502**.

Sanders, J. E. , Fryer, J. L. 1986. Genus *Renibacterium*. Section 14, Volume 2, **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. pp. **1253-1254**.

Shimazu, K. , Puchi, M. H. 1984. Enfermedad Bacteriana del Riñón en Ensenada y Puerto Aguirre, XI Región. **Informe de Circulación Restringida, Sernap**. **9p**.

Smith, I. W. 1964. The occurrence and pathology of Dee disease. **Freshwater and Salmon Fisheries Research DAFS: 1-12**. **34**. **Edinburgh: HMSO**

Smith, P. A. 2000. Mecanismos de Infección de Patógenos Bacterianos en Peces Salmonídeos. **Libro de Resúmenes IV Jornadas de Salmonicultura- XI Congreso de Medicina Veterinaria**. Puerto Varas, Chile. **25-27 de octubre**. p. **61-64**.

Young, C. L. , Chapman, G. B. 1978. Ultrastructural aspects of the causative and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Journal of Fisheries Research Board of Canada** **35:1234-1248**.

Wiens, G. D. , Kaattari, S. L. 1989. Monoclonal antibody analysis of common surface protein(s) of *Renibacterium salmoninarum*. **Fish Pathology** **24:1-7**.

Wolf, K. , Dunbar, C. E. 1959. Test of 34 therapeutic agents for control of kidney disease in trout. **Transactions of the American Fisheries Society** **88:117-124**.