

## VIBRIOSIS EN EL LENGUADO *Paralichthys adspersus* (STEINDACHNER, 1867) EN CAUTIVERIO.

CLAUDIO D. MIRANDA<sup>1</sup> Y RODRIGO ROJAS<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Miranda, C.D. & R. Rojas. 1996. Vibriosis in the flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) in captivity. Revista de Biología Marina, Valparaíso 31(1):1-9.

Different pathologies have been observed in an experimental culture of the flounder *Paralichthys adspersus*, characterized by inflamed bloody eyes, haemorrhagic areas in the mouth and gills and disintegrated lower jaws.

The disease symptoms were arrested by daily treatments with oxolinic acid and oxitetracycline for one week, thus confirming the bacterial etiology of the lesions.

Eight *Vibrio* strains were isolated as pure cultures from streaking of material swabbed from lesions in flounder specimens onto TCBS and tryptic soy agar prior to antibiotic treatment.

The phenotypical characterization of the present isolates identified the *Vibrio* strains as *V. splendidus* biotype II (5) and *V. anguillarum*-like (3).

All the *Vibrio* strains isolated from diseased flounders displayed susceptibility to chloramphenicol, oxolinic acid, and trimethoprim-sulphamethoxazole, and seven strains were susceptible to oxitetracycline.

**Key words:** aquaculture, pathology, *Vibrio*, bacteriology.

**RESUMEN:** Miranda, C.D. & R. Rojas. 1996. Vibriosis en el lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) en cautiverio. Revista de Biología Marina, Valparaíso 31(1):1-9.

Diferentes patologías han sido observadas en un cultivo experimental del lenguado *Paralichthys adspersus*, caracterizadas por ojos inflamados sanguinolentos, áreas hemorrágicas en la boca y las branquias y las mandíbulas inferiores desintegradas.

Las diferentes manifestaciones de la enfermedad fueron detenidas por tratamientos diarios con ácido oxolinico y oxitetraciclina por una semana, confirmando así la etiología bacteriana de las lesiones.

Se aislaron 8 cepas de *Vibrio* como cultivo puro desde el estriado del material infectado de los lenguados enfermos sobre agar TCBS y tripticasa de soya, previo al tratamiento antibiótico.

La caracterización fenotípica de los aislamientos identificó a las cepas de *Vibrio* como *V. splendidus* biotipo II (5) y *V. anguillarum*-like (3).

Todas las cepas de *Vibrio* aisladas de los lenguados enfermos mostraron susceptibilidad al cloranfenicol, ácido oxolinico, y sulfametoxazol trimetoprim, y siete cepas además exhibieron sensibilidad a la oxitetraciclina.

**Palabras claves:** acuicultura, patología, *Vibrio*, bacteriología.

1) Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Casilla 117, Coquimbo, Chile.

## INTRODUCCION

La vibriosis ha llegado a ser la enfermedad económicamente más importante en cultivos de peces marinos, afectando un gran número de especies (Toranzo *et al.* 1989, Toranzo & Barja 1990).

En el cultivo de peces planos, diversos autores han reportado la participación de algunas especies de *Vibrio* en procesos patológicos (Devesa *et al.* 1985, Devesa *et al.* 1989, Myhr *et al.* 1991, Fouz *et al.* 1992), aunque no ha sido posible determinar si tales infecciones son de carácter primario u oportunista (Robohm & Brown 1978, Barja & Toranzo 1989, Austin *et al.* 1993).

Algunos estudios han demostrado que la mayoría de las patologías en peces planos ocurre por la penetración de los agentes infecciosos a través de la piel, no descartándose la posibilidad de infección a través de las branquias y el tracto intestinal (Masumura *et al.* 1989, Novoa *et al.* 1992).

En Chile, el cultivo de *P. adspersus* aún se encuentra a nivel experimental, por lo que no existe información acerca de microorganismos patógenos aislados de ejemplares de esta especie en cautiverio.

Los objetivos del presente estudio fueron (i) aislar y caracterizar fenotípicamente los agentes etiológicos de procesos infecciosos desarrollados en un cultivo experimental del lenguado *P. adspersus* y (ii) caracterizar y determinar los patrones de susceptibilidad a agentes antimicrobianos de uso habitual en acuicultura de los aislamientos bacterianos.

## MATERIALES Y METODOS

### PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Se tomaron muestras de las áreas dañadas de los ejemplares enfermos mediante el uso de

tóriculas estériles, las que se estiraron simultáneamente sobre placas con agar tripticosa de soya (TSA Difco labs.) suplementado con NaCl (2%) y sobre agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS Difco labs.). Las placas se incubaron a 22°C por 48 horas y se aislaron 8 cepas bacterianas provenientes de diferentes ejemplares de los peces enfermos.

### CARACTERIZACION DE LOS AISLAMIENTOS.

Cultivos puros de colonias aisladas fueron caracterizados morfológica, bioquímica y fisiológicamente de acuerdo a los procedimientos de Cowan (1974) y West & Colwell (1984). Los medios de cultivo se suplementaron con NaCl (2%), y los resultados fueron registrados al cabo de un período de incubación de 7 días a 22°C. La identificación de las cepas de *Vibrio* se realizó de acuerdo a los esquemas propuestos por Baumann & Schubert (1984), Farmer & Hickman-Brenner (1992) y Alsina & Blanch (1994). La totalidad de los aislamientos fueron re-examinados para evaluar la reproducibilidad de cada ensayo.

Los perfiles fenotípicos de las cepas aisladas fueron comparados con aquellos de otras cepas de *Vibrio* asociadas con procesos patológicos en ejemplares de turbot (*Scophthalmus maximus* L.).

### SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIOTICA.

La susceptibilidad de los aislamientos bacterianos a diversos agentes antimicrobianos se determinó mediante la técnica de difusión en placa (Barry & Thornsberry 1985), utilizando placas con agar Mueller-Hinton (Difco labs.) suplementadas con NaCl (2%).

Los agentes antimicrobianos y sus concentraciones por sensidisco (Oxoid, Unipath Ltd., Hampshire, U.K.) fueron, (en microgramos): ampicilina (10), carbenicilina (100), amikacina (30), gentamicina (10), kanamicina (30), estreptomycin (10), clo-ranfenicol (30), oxitetraciclina (30), ácido oxolínico (2) y sulfametoxazol trimetoprim (23,75 y 1,25 respectivamente).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Diversos cuadros clínicos fueron observados en ejemplares de *P. adspersus* en cautiverio. La sintomatología externa de los procesos infecciosos, así como los órganos afectados fueron muy variables (Tabla 1), observándose áreas hemorrágicas en la boca y las branquias, desintegración parcial de la mandíbula inferior (Fig. 1) y exoftalmia con acúmulos sanguíneos (Fig. 2).



Figura 1. Mandíbula desintegrada en reproductor de *Paralichthys adspersus*.



Figura 2. Lesión ocular en reproductor de *Paralichthys adspersus*.

Tabla 1: Cepas bacterianas aisladas de procesos patológicos en *Paralichthys adspersus*.

CEPA	SINTOMATOLOGIA
1	Boca roja
2	Mandíbula inferior destruida
3	Boca roja
4	Boca roja
5	Ojo derecho inflamado y destruido
6	Ojo derecho inflamado y destruido
7	Abceso en zona dorsal
8	Mandíbula inferior destruida

Es así que la sintomatología externa de estas vibriosis atípicas en lenguado fueron lesiones centradas en la boca y la cabeza produciendo manifestaciones clínicas similares al síndrome entérico de la boca roja experimentada por los salmonoideos infectados por *Yersinia ruckeri* (Fouz *et al.* 1992).

La sintomatología externa, aunque variable evidenciaría que la mayoría de los procesos patológicos observados se desarrollaron por medio de mecanismos invasivos (Levin *et al.* 1972, Horne *et al.* 1977, Watkins *et al.* 1981, Rasheed 1989) sugiriendo una participación importante de enzimas de carácter proteolítico y lipolítico.

El estriado de las áreas lesionadas de los lenguados enfermos propició el desarrollo de cultivos de *Vibrio* casi puros sobre agar tripticasa de soya y TCBS (Fig. 3), estimándose a tales microorganismos como los agentes etiológicos de los cuadros patológicos observados.

La caracterización fenotípica de los aislamientos bacterianos mostró que las cepas en estudio presentaron una gran variabilidad fenotípica, característica de los representantes del género *Vibrio* (West *et al.* 1982).



Figura 3. Aislamiento bacteriano en agar TCBS de muestra de lesión ocular.

El perfil fenotípico de las cepas aisladas de los lenguados infectados compartió algunas características bioquímicas

importantes en común con el grupo *V. anguillarum* - *V. splendidus* tal como el espectro de descarboxilación de arginina,

lisina y ornitina (A+, L-, O-) (West & Colwell 1984, Barja & Toranzo 1989, Alsina & Blanch 1994). De acuerdo a esquemas de identificación pre-establecidos (Alsina & Blanch 1994), las cepas pudieron asimilarse a la especie *V. splendidus* biotipo II (cepas 1, 2, 3, 4 y 6) y *V. anguillarum*-like (cepas 5, 7 y 8).

Las cepas identificadas como *V. anguillarum* se caracterizaron por su capacidad para crecer en NaCl (8%) y fermentar la sacarosa, en contraposición a las cepas pertenecientes a *V. splendidus* biotipo II las que fueron incapaces de fermentar la sacarosa y pudieron resistir la ampicilina (Tabla 1).

La comparación de las características bioquímicas y fisiológicas de los aislamientos (Tabla 2), con cepas de *Vibrio* aisladas de mortalidades en cultivo del turbot *S. maximus*, evidenciaron que las cepas de *V. splendidus* biotipo II y *V. anguillarum* provenientes del cultivo de lenguado presentaron algunas características fenotípicas distintas tales como la incapacidad para fermentar los carbohidratos L-arabinosa y sorbitol a diferencia de las cepas pertenecientes a las mismas especies provenientes de los cultivos de turbot.

Cabe hacer notar que la totalidad de las cepas bacterianas aisladas resultaron incapaces de producir acetoina (Voges-Proskauer negativo) en contraposición a los aislamientos realizados de cuadros patológicos en el turbot (Angulo *et al.* 1994).

En términos generales se observaron varios casos de infecciones bacterianas en ejemplares del lenguado *P. adspersus* mantenidos en cautiverio. Considerando que no existen problemas de alta densidad de carga y que por lo general, sólo se desarrollaron cuadros clínicos sólo en algunos de los

ejemplares presentes en un estanque, no existiendo brotes infecciosos generalizados, es posible concluir que estas patologías fueron de carácter oportunista, lo que se ve en cierta forma reafirmado por los tipos de microorganismos involucrados en estas infecciones, ya que *Vibrio* por lo general no es considerado un agente causante de infecciones primarias en peces marinos (Miranda & Rojas 1993).

Es importante considerar que por lo general los procesos infecciosos desarrollados se produjeron en un estanque alimentado con dieta experimental, utilizando pellet seco en reemplazo del alimento húmedo de uso habitual preparado a partir de peces frescos. Ello podría haber contribuido a estados de inmunodepresión producto de posibles deficiencias nutricionales. Por otra parte, la mayoría de las patologías descritas ocurrieron durante el verano, observándose alzas importantes de la temperatura del agua del cultivo lo que proporcionaría incrementos importantes en las densidades de vibrios presentes en el sistema. Por lo anterior es posible concluir que el alza en la temperatura favorecería la invasión de las cepas de *Vibrio* en los lenguados previamente debilitados por esta situación de estrés.

Por lo general, las terapias antimicrobianas aplicadas, sobre la base de oxitetra-ciclina y ácido oxolínico fueron muy efectivas para revertir la mayoría de los cuadros patológicos descritos, lo cual se ve avalado por los perfiles de resistencia a antimicrobianos (Tabla 3).

Los perfiles de resistencia a antimicrobianos permiten argüir que aún no se desarrollan procesos significativos de multi-resistencia posibilitando una alta eficiencia de los mecanismos tradicionales de quimioterapia.

Tabla 2. Caracterización comparativa de las cepas de *Vibrio* aisladas del lenguado (*Paralichthys adspersus*), con cepas asociadas a mortalidades de turbot (*Scophthalmus maximus* L.).

CARACTER	CEPAS BACTERIANAS*													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en TCBS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	V	V	V	V	A	V	A	A	A	A	V	A	A	V
Resistencia a:														
O/129 (150 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina (10 µg)	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R
Indol	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Reducción de Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Descarboxilación de:														
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Crecimiento en:														
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OF de Leifson	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Gas de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fermentación de:														
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Sacarosa	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* (1-8) Aislamientos del cultivo de lenguados de la Universidad Católica del Norte; (9) *V. splendidus* biotipo I (Angulo *et al.* 1994); (10) *V. splendidus* biotipo I RG-53 (Lupiani *et al.* 1989); (11) *V. splendidus* biotipo II M-6 (Lupiani *et al.* 1989); (12) *V. anguillarum* serotipo 01 R-82 (Toranzo *et al.* 1987); (13) *V. anguillarum* serotipo 02 V-22 (Toranzo *et al.* 1987); (14) *V. damsela* RG-91 (Fouz *et al.* 1992). V: colonias verdes, A: colonias amarillas, R: resistente, S: sensible

Tabla 3: Patrones de susceptibilidad a agentes antimicrobianos de las cepas aisladas.

ANTIMICROBIANOS	CEPAS BACTERIANAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ampicilina	R	R	S	R	S	R	R	R
Carbenicilina	R	R	S	S	S	R	R	S
Amikacina	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	R	R	S	R	R	R
Kanamicina	R	S	S	R	S	R	R	R
Estreptomicina	R	R	R	R	S	R	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S
Oxitetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	R
Acido Oxolínico	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfametoxazol Trimetoprim	S	S	S	S	S	S	S	S

R: Resistente;

S: Sensible

## CONCLUSIONES

Los antecedentes expuestos acerca de los casos de vibriosis observados en el cultivo experimental del lenguado *P. adspersus* permiten argüir que tales procesos patológicos son de carácter oportunista asociados con situaciones de estrés tales como cambios en la dieta y/o alzas de temperatura.

La variada sintomatología observada para los casos de vibriosis reportados en el presente estudio es variable y característica de procesos de carácter invasivo.

Existe una participación importante en los cuadros infecciosos descritos de vibrios

no fermentadores de sacarosa identificados como *V. splendidus*, coincidiendo con patologías observadas en el cultivo de turbot (Devesa *et al.* 1985, Fouz *et al.* 1992).

Las cepas bacterianas aisladas no presentaron niveles importantes de multiresistencia a agentes antimicrobianos y en contraposición, todas las cepas bacterianas son susceptibles al cloranfenicol, ácido oxolínico y sulfametoxazol trimetoprim.

Se recomienda una estrategia adecuada de manejo del cultivo y la implementación de monitoreos bacterianos periódicos para evitar brotes de infecciones por *Vibrio*.

## LITERATURA CITADA

- Alsina, M. & A.R. Blanch. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 79-85.
- Angulo, L.; Lopez, J.E.; Vicente, J.A. & A.M. Saborido. 1994. Haemorrhagic areas in the mouth of farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 17: 163-169.

- Austin, B.; Stobie, M.; Robertson, P.A.W.; Glass, H.G.; Stark, J.R. & M. Mudarris. 1993. *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L., in a Scottish aquarium. *Journal of Fish Diseases* 16: 277-280.
- Barja, J.L. & A.E. Toranzo. 1989. Enfermedades infecciosas en peces planos. En: Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas. Seminario de Estudos Galegos 3: 99-113.
- Barry, A.L. & C. Thornsberry. 1985. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler Jr. & H.J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edn, p. 978-987. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Baumann, P. & R.H.W. Schubert. 1984. *Vibrionaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Krieg N. R. and Holt J. G. (eds.). Vol. I: 516-575. Williams and Wilkins, Baltimore
- Cowan, S.T. 1974. *Cowan & Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 2nd. ed. Cambridge University Press., Cambridge, 238 p.
- Devesa, S.; Toranzo, A.E. & J.L. Barja. 1985. First report of vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) cultured in North West of Spain. In: A.E. Ellis (ed.) "Fish and Shellfish Pathology" Academic Press. London.
- Devesa, S.; Barja, J.L. & A.E. Toranzo. 1989. Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), *Journal of Fish Diseases* 12: 323-333.
- Farmer, J.J. & F.W. Hickman-Brenner. 1992. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K.-H. (eds). *The Prokaryotes*. p. 2952-3011. Springer Verlag, New York.
- Fouz, B.; Larsen, J.L.; Nielsen, B.; Barja, J.L. & A.E. Toranzo. 1992. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 155-166.
- Horne, M.T.; Richards, R.H.; Roberts, R.J. & P.C. Smith. 1977. Peracute vibriosis in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fish Biology* 11: 355-361.
- Levin, M.A.; Wolke, R.E. & V.J. Cabelli. 1972. *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Microbiology* 18: 1585-1592.
- Lupiani, B.; Dopazo, C.P.; Ledo, A.; Fouz, B. & J.L. Barja. 1989. New syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Aquatic Animal Health* 1: 197-204.
- Masumura, K.; Yasunobu, H.; Okada, N. & K. Muroga. 1989. Isolation of a *Vibrio* sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathology* 24: 135-141.
- Miranda, C. & R. Rojas. 1993. Prevalencia de patologías oportunistas en el cultivo experimental del lenguado, *Paralichthys adspersus*. *Anales de Microbiología* 1: 51-54.
- Myhr, E.; Larsen, J.L.; Lillehaug, A.; Gudding, R.; Heum, M. & T. Hastein. 1991. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species from farmed fish in Norway. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2750-2757.
- Novoa, B., Nuñez, S.; Fernandez-Puentes, C.; Figueras, A.J. & A.E. Toranzo. 1992. Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology. *Aquaculture* 107: 253-258.
- Rasheed, V. 1989. Vibriosis outbreak among cultured seabream (*Acanthopagrus cuvieri*) broodstock in Kuwait. *Aquaculture* 76: 189-197.
- Robohm, R.A. & C. Brown. 1978. A new bacterium (presumptive *Vibrio* species) causing ulcers in flatfish. *Marine Fisheries Review* 40: 5-7.



- Toranzo, A.E.; Ledo, A.; Santos, Y.; Romalde, J.L.; Bandin, I.; Fouz, B. & J.L. Barja. 1989. Evaluation of the bacterial fish diseases in trout, salmon and turbot cultured in northwest of Spain. European Aquaculture Society Special Publication 10: 247-248.
- Toranzo, A.E. & J.L. Barja. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. Diseases of Aquatic Organisms 9: 73-82.
- Toranzo, A.E.; Santos, Y.; Lemos, M.L.; Ledo, A. & J. Bolinches. 1987. Homology of *Vibrio anguillarum* strains causing epizootics in turbot, salmon and trout reared on the Atlantic coast of Spain. Aquaculture 67: 41-52.
- West, P.A.; Brayton, P.R.; Bryant, T.N. & R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. International Journal of Systematic Bacteriology 36: 531-543.
- West, P.A. & R.R. Colwell. 1984. Identification and classification of Vibrionaceae. An overview. In: R. R. Colwell (ed.) Vibrios in the environment, p. 285-363. John Wiley & Sons, Chichester.
- Watkins, W.D.; Wolke, R.E. & V.J. Cabelli. 1981. Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* for juvenile winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 38: 1045-1051.

*Manuscrito recibido en septiembre de 1995 y aceptado en diciembre de 1995*