



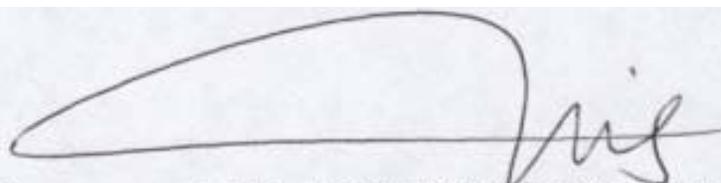
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Instituto de Patología Animal  
Ictiopatología

Estudio de Leucemia Linfoblástica y su asociación con otras  
enfermedades en salmonideos de cultivo intensivo  
en fase marina del Sur de Chile

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Grado de LICENCIADO EN  
MEDICINA VETERINARIA.

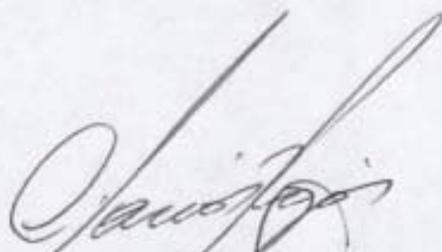
Juan Pablo Núñez Núñez  
Valdivia Chile 1997

PROFESOR PATROCINANTE

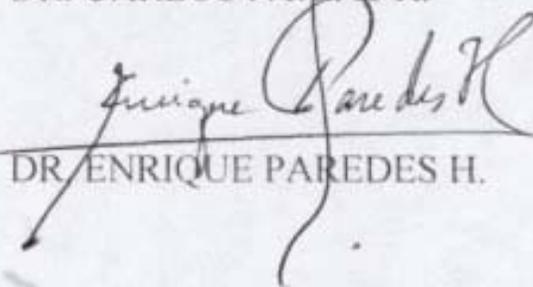


: DR. RICARDO ENRIQUEZ S.

PROFESORES CALIFICADORES



: DR. CARLOS FARIAS R.



DR. ENRIQUE PAREDES H.

**FECHA DE APROBACION**

**: 24 DE ENERO DE 1997**

A Dios, a mamita y a la  
memoria de papito (Q.E.P.D.).

## INDICE

1. RESUMEN .....	1
2. SUMMARY .....	2
3. INTRODUCCION .....	3
4. MATERIAL Y METODO .....	6
5. RESULTADOS.....	11
6. DISCUSION .....	27
7. BIBLIOGRAFIA .....	36
ANEXOS .....	41
AGRADECIMIENTOS .....	46

## ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA Y SU ASOCIACION CON OTRAS ENFERMEDADES EN SALMONIDEOS DE CULTIVO INTENSIVO EN FASE MARINA EN EL SUR DE CHILE.

### 1. RESUMEN

Antecedentes de la presencia de una nueva enfermedad diagnosticada como "**Leucosis Linfoblástica**" en peces de aproximadamente 1 kg. de peso, motivaron la ejecución de un muestreo dirigido entre Octubre de 1995 y Enero de 1996, de 403 peces clínicamente enfermos en fase marina, de los cuales 25.3% correspondieron a *Oncorhynchus kisutch*, 28.8% a *Oncorhynchus mykiss* y 45.9% a *Salmo salar* provenientes de 30 centros de cultivo distribuidos en la X y XI regiones del país (Latitud 41° 20' S - 45° 15' S), con el objetivo de determinar el nivel de prevalencia y distribución geográfica de esta patología y su posible asociación con otras enfermedades.

A la totalidad de los peces se les realizó examen clínico externo e interno, estudio sanguíneo y tinciones de Giemsa y Gram en frotis e improntes de tejidos. De los peces clínicamente sospechosos a *L. Linfoblástica* se obtuvieron muestras de tejidos para exámenes histológicos, test de ELISA, microscopía electrónica y frotis de tejidos para el test de IFAT.

Se observó que la prevalencia general de *L. Linfoblástica* fue de 3.7%, presentándose principalmente en *O. kisutch* y *O. mykiss* y todos los casos positivos se observaron distribuidos en la X región, específicamente en las áreas de Chiloé, Río Negro Hornopirén - Cholgo y Fiordo de Reloncaví - Ralún. Un 46.7% de los casos se presentaron asociados al Síndrome Rickettsial Salmonídeo y un 26.7% a la Enfermedad Bacteriana del Riñón. Los peces con *L. Linfoblástica* se caracterizaron clínicamente por presentar natación superficial y letárgica, oscurecimiento de la piel, palidez branquial y ocasionalmente exoftalmia bilateral. Internamente, esplenomegalia, renomegalia y acumulación de líquido en el estómago. En los exámenes de laboratorio los peces presentaron principalmente anemia, aumento del nivel de la Capa Flogística y Leucocitosis. Histológicamente se caracterizaron por una infiltración de células inmaduras con características de linfoblastos en órganos hematopoyéticos y no hematopoyéticos, en las cuales se observó ocasionalmente la presencia de esporas gran positivas intranucleares correspondientes a la fase madura del parásito microsporídeo *Enterocytozoon (Nucleospora) salmonis* y partículas virales similares a retrovirus.

En consecuencia, *L. Linfoblástica* corresponde en sus características a una enfermedad neoplásica observada desde 1988 en salmones chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) en Canadá y Estados Unidos denominada "Anemia Marina" o "Leucemia Plasmacitoídea".

De acuerdo a los resultados y discusión de este estudio se ha sugerido denominar a esta patología como *Leucemia Linfoblástica*.

PALABRAS CLAVES: Leucosis - Leucemia - Linfoblastos - Microsporídeo - Retrovirus.

## STUDIES ON LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA AND ITS RELATIONSHIP WITH OTHERS DISEASES OF SALMON FISH UNDER INTENSIVE MARINE CULTURE CONDITIONS IN SOUTHERN CHILE.

### 2. SUMMARY

Evidences of the existence of a new fish in Southern Chile named "**Lymphoblastic Leukosis**" have been suggested. This findings suggested that it was necessary to screen the fish in order to determine the prevalence, geographic distribution of disease and their possible relationship in with other fish diseases. The study was carry out from October 1995 to January 1996, in 30 marine sites located in the X and XI region of the country (Latitude 41° 20' S - 45° 15' S). A total number of 403 moribund fish were tested, 25.3% of them were *Oncorhynchus kisutch*, 28.8% *Oncorhynchus mykiss* and 45.9% *Salmo salar*.

Complete post-mortem examination was performed in all the sampled fish including blood analysis and Giemsa and Gram staining from blood and tissue smears and imprints. Those fish which showed lesions similar to "**L. Leukosis**" were additionally submitted to histopathological, ELISA, IFAT and electron microscopy analysis. It was shown that 3.7 % of the sampled fish were positive to "L. Leukosis" affecting mainly to *O. kisutch* and *O. mykiss*. The only area were the disease was detected was the X region, particularly the areas of Chiloe, Rio Negro Hornopiren - Cholgo and Reloncave fiord - Ralun.

Some of the fish positive to "**L. Leukosis**" were also affected with *Piscirickettsia salmonis* and *Renibacterium salmoninarum* ( 46.7% and 26.7%, respectively). Positive fish to "**L. Leukosis**" showed abnormal swimming behaviour, lethargy, darkness of the skin, pale gills, bilateral exophthalmus, enlargement of the spleen and kidney and also excess of fluid in the stomach. The laboratory test of those fish mainly showed anaemia, increase of the flogistic layer and leukocytosis. Histopathologically the disease was characterized by an infiltration of immature cells resembling lymphoblastic cells both in haematopoietic and non haematopoietic tissues. Sometimes Gram positive intranuclear spores were observed in those tissues which corresponded to mature stages of the parasite *Enterocytozoon (Nucleospora) salmonis*. By electron microscopy viral particles similar to retrovirus were observed.

The results from the present study showed that the Chilean "**L. Leukosis**" disease share many characteristics with the disease observed since 1988 in *Oncorhynchus tshawytscha* in Canada and the United States named "Marine Anemia" or "Plasmacytoid Leukaemia". The histopathological characteristics of disease suggested that it should be named "**Lymphoblastic Leukaemia**".

KEY WORDS: Leukosis - Leukaemia - Lymphoblasts - Microsporidium - Retrovirus.

### 3. INTRODUCCION

En Chile la salmicultura se inició con la introducción de especies salmonídeas a fines del siglo pasado. Desde entonces, lentamente se fue estableciendo un tipo de producción que se ha desarrollado espectacularmente desde comienzos de la década de los '80 (Méndez y Munita, 1989; Achurra, 1992), consolidándose definitivamente en los últimos años. Desde 1992 el país ostenta el segundo lugar a nivel mundial en la exportación de salmón cultivado (Achurra, 1992; Bravo, 1993; Méndez y Vidal, 1994), aportando un poco más del 17 % de la producción mundial total (Infante, 1996<sup>1</sup>). Entre 1992 y 1995 la producción nacional de salmónes creció en un 64 %, pasando de 62.147 a 101.958 toneladas, de las cuales el 33.5 % correspondió a salmón del atlántico (*Salmo salar*), 33.8 % a salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y un 33.2 % a trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Para 1996 se estima una producción total de 145.000 toneladas (Mardones y col., 1995). De esta forma, la salmicultura nacional se ha convertido en una de las principales fuentes de recursos para la X y XI regiones del país, participando activamente en el desarrollo de ellas (Achurra, 1992).

Sin duda, el éxito de la salmicultura nacional a corto o largo plazo está íntimamente relacionado con la presencia de enfermedades (Trust, 1986; Bustos, 1993). La histórica ventaja de Chile como poseedor de un ambiente libre de ictiopatologías se ha ido perdiendo paulatinamente (Méndez y Vidal, 1994), originado en parte, por el alto nivel de importación de ovas que mantiene Chile (Bravo, 1992; Mardones y Vega, 1993; Méndez y Vidal, 1994; Mardones y col., 1995). Las importaciones de ovas en su mayoría provienen desde países que presentan serios problemas de enfermedades infecto-contagiosas, algunas de ellas de etiología desconocida, causantes de altas mortalidades y elevadas pérdidas económicas (Macchiavello, 1992; Bravo, 1993).

En 1988 en British Columbia, Canadá, se diagnosticó por primera vez en salmónes chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) de fase marina, una enfermedad referida como "Anemia Marina" o "Leucemia Plasmacitoídea" (Kent y col., 1990; Kent y col., 1991; Newbound y Kent, 1991 a; Eaton y Kent, 1992; Eaton y col., 1993; Newbound y col., 1993; Eaton y col., 1994). Los primeros casos observados se presentaron en peces de 2 a 4 Kg. de peso, causando 50 % de mortalidad aproximadamente, lo cual se repitió el año siguiente (Kent y col., 1990). Newbound y Kent (1991 a), comunicaron mortalidades de hasta 80 % en salmónes precosecha. También se han comunicado mortalidades de hasta 13 % en smolts debido a esta causa (Kent y col., 1993). Una enfermedad similar fue descrita en salmónes chinook (*O. tshawytscha*) adultos y juveniles cultivados en agua dulce en los estados de California y Washington, Estados Unidos (Hedrick y col., 1990; Kent y col., 1990; Morrison y col., 1990; Hedrick y col., 1991; Newbound y col., 1993).

Actualmente en Chile hay reportes de una enfermedad similar que provoca elevadas mortalidades en salmónes de diferentes edades con manifestaciones clínicas

---

<sup>1</sup> Comunicación Personal. Rodrigo Infante (1996). Gerente General de Asociación de Productores de Salmón y Trucha de Chile, A.G.

inespecíficas como tumefacción renal y exoftalmia. Al estudio histopatológico se diagnostica como "**Leucosis Linfoblástica**" (Cubillos, 1995<sup>2</sup>).

Se sospecha que los agentes causantes de esta enfermedad son dos: un parásito microsporídeo intranuclear, comunicado como *Enterocytozoon salmonis* (Hedrick y col., 1990; Eaton y Kent, 1992; Newbound y col., 1993), también denominado *Nucleospora salmonis* (Kent, 1995<sup>3</sup>); y un retrovirus oncogénico (Kent y col., 1990; Kent y col., 1991; Newbound y Kent, 1991 a; Eaton y Kent, 1992; Eaton y col., 1993; Newbound y col., 1993; Eaton y col., 1994).

*E. (Nucleospora) salmonis*, es un parásito que infecta el núcleo de hemoblastos, particularmente linfoblastos o "plasmoblastos", cuyas esporas ovoides de 1x2 µm uninucleadas, poseen un tubo polar enrollado con 8-12 vueltas alrededor de su citoplasma (Chilmonczyk y col., 1991). Este parásito fue observado por primera vez en 1987 en salmones **chinook (O. tshawytscha)** con anemia cultivados en fase marina, en Washington, Estados Unidos (Hedrick y col., 1991). También fue reportado en salmones chinook (*O. tshawytscha*] adultos y juveniles de agua dulce afectados con severa anemia, y en trucha arcoiris (*O. mykiss*) en Washington, California e Idaho, Estados Unidos (Baxa-Antonio y col., 1992). Las infecciones por este parásito se cree que están asociadas con enfermedades neoplásicas involucrando masivas linfoproliferaciones conocidas como "**Leucemia Plasmacitoídea**" (Kent y col., 1990).

Los retrovirus pertenecen a la familia *Retroviridae*, los cuales están constituidos por RNA de cadena simple con envoltura, poseen características oncogénicas y su principal característica bioquímica es la posesión de una enzima, *transcriptasa reversa*, que es una DNA-polimerasa dependiente del RNA (Horzinek, 1980; Gibbs, 1987; Evermann, 1990; Riedemann, 1992; Bowser, 1993). Los retrovirus pueden infectar y causar enfermedades neoplásicas en peces (Bowser, 1993), por lo cual se cree que el probable agente de la leucemia del salmón es un retrovirus denominado *Salmon leukemia virus (SLV)*, el cual ha sido encontrado en peces con *Leucemia Plasmacitoídea*, pero no en peces sanos (Eaton y Kent, 1992; Eaton y col., 1994). Estudios de transmisión efectuados en salmón chinook (*O. tshawytscha*), indican que la etiología de esta enfermedad se debe, al menos en parte, a *SLV* (Kent y Dawe, 1993; Eaton y col., 1994).

Los peces afectados se observan nadando superficialmente, letárgicos y con el dorso oscuro. Externamente, los signos clínicos más relevantes que se observan son marcada palidez branquial y exoftalmia bilateral debido al acumulo infiltrado neoplásico en el tejido periorbital (Newbound y Kent, 1991 a). Internamente, la signología clínica de mayor importancia diagnóstica que se observa es esplenomegalia y renomegalia. En menor grado se observa presencia de petequias en hígado, grasa mesentérica, páncreas, corazón y músculo esquelético; también se presenta engrasamiento de la pared intestinal y en algunos casos se evidencia ascitis serosa o serosanguinolenta (Kent y col., 1990). En relación al hematocrito, se ha determinado que su valor en los peces afectados desciende en forma variable (Kent y col., 1990).

---

<sup>2</sup> Comunicación Personal Victor Cubillos (1995) Instituto de Patología Animal. Universidad Austral de Chile.

<sup>3</sup> Comunicación Personal. Michael Kent (1995). Pacific Biological Station. Nanaimo, Canadá.

Al estudio histológico de peces afectados se observa proliferación e infiltración de "plasmoblastos" en diversos órganos, incluyendo riñón, bazo, hígado, intestino, páncreas, grasa mesentérica, corazón, músculo esquelético, piel, meninges y ojo (Kent y col., 1990; Kent y col., 1991; Eaton y Kent, 1992; Bowser, 1993; Eaton y col., 1994; Newbound y col., 1995).

Los métodos de diagnóstico para **Leucemia Plasmacitoídea** están basados en cambios patológicos severos que se producen en los órganos afectados, por lo cual, se realizan diagnósticos presuntivos a través de tinciones Gram y Giemsa de impresiones de órganos afectados (Newbound y col., 1993) y según Stephen y col. (1995), el diagnóstico de **L. Plasmacitoídea** es confirmado mediante análisis histológico de órganos afectados. Por otra parte, se han efectuado diversos estudios tendientes a obtener otros métodos de diagnóstico; de esta forma, Eaton y Kent (1992) realizaron mediciones de niveles de actividad de transcriptasa reversa, la cual estaría asociada a la presencia de retrovirus. Por otra parte, Newbound y col. (1993), elaboraron anticuerpos monoclonales (Mabs) contra "plasmoblastos" aislados de peces con **Leucemia Plasmacitoídea** para determinar la reacción de estos anticuerpos con antígenos específicos de "plasmoblastos" de peces que padecían de esta enfermedad. En otro intento, Wongtavatchai y Hedrick (1993), desarrollaron un medio de cultivo especial *para E. (Nucleospora) salmonis*, obteniendo sangre, tejido renal y esplénico de peces infectados experimentalmente con **L. Plasmacitoídea**.

Por otra parte, se han efectuado estudios de transmisión, demostrando que **L. Plasmacitoídea** es fácilmente transmisible mediante inyección intraperitoneal de tejido homogenizado infectado (Newbound y Kent, 1991 a). Mientras tanto, Kent y col. (1993), concluyeron que la transmisión horizontal es posible en agua dulce. Y según observaciones efectuadas, se sugiere que **L. Plasmacitoídea** podría transmitirse verticalmente (Kent y col., 1993).

En relación a la susceptibilidad interespecies se ha demostrado que salmón chinook (*O. tshawytscha*) y salmón del atlántico (***S. salar***) son susceptibles a **L. Plasmacitoídea** mediante inyección intraperitoneal de tejido homogenizado infectado. Por el contrario, salmón coho (***O. kisutch***) y trucha arcoiris (***O. mykiss***) parecen ser resistentes (Newbound y Kent, 1991 a).

Dado lo anterior, se plantea como hipótesis que **L. Linfoblástica** corresponde a la enfermedad diagnosticada en Canadá y Estados Unidos como **L. Plasmacitoídea** y que esta enfermedad tiene algún nivel de asociación con enfermedades de alta incidencia como SRS y BKD en salmonídeos cultivados en forma intensiva en el Sur de Chile. Para ello se fijaron como objetivos estudiar la prevalencia de esta enfermedad en salmonídeos de cultivo intensivo en fase marina en la X y XI regiones del país, a través de un muestreo dirigido, considerando tres especies: salmón coho (***O. kisutch***), trucha arcoiris (***O. mykiss***) y salmón del atlántico (***S. salar***) y establecer si existe o no asociación entre **L. Linfoblástica**, el Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS) y la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD). Además, obtener información acerca de la distribución geográfica de esta enfermedad en cada una de las regiones estudiadas.

## 4. MATERIAL Y METODO

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 LUGARES DE MUESTREO

Se estudiaron 30 centros de cultivo intensivo de salmonídeos en fase marina, pertenecientes a 15 empresas ubicadas en la X y XI regiones del país (**latitud 41° 20'S - 45° 15'S**). Cada región se dividió en zonas geográficas específicas las cuales contemplaron un número determinado de centros de cultivos distribuidos como se presenta en la siguiente Tabla:

TABLA N°1: Distribución del total de centros de cultivo y empresas, según región, zona y área geográfica estudiadas.

REGION	ZONA	AREA GEOGRAFICA	CENTROS DE CULTIVO	EMPRESAS MUESTREADAS
X	1	Puerto Montt - Calbuco	5	4
	2	F. Reloncaví - Ralún	4	2
	3	Río Negro Hornopirén - Cholgo	6	2
	4	Chiloé Insular (Sector Norte)	7	3
	5	Chiloé Insular (Sector Sur)	5	2
SUBTOTAL			27	13
XI	6	Puyuhuapi	1	1
	7	Puerto Chacabuco	2	1
SUBTOTAL			3	2
TOTAL			30	15

#### 4.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico lo constituyeron 403 peces clínicamente enfermos muestreados entre Octubre de 1995 y Enero de 1996, de los cuales 185 (45.9 %) a salmón del atlántico (*S. salar*)., 116 (28.8 %) a trucha arcoiris (*O. mykiss*) y 102 (25.3 %) correspondieron a salmón coho (*O. kisutch*)

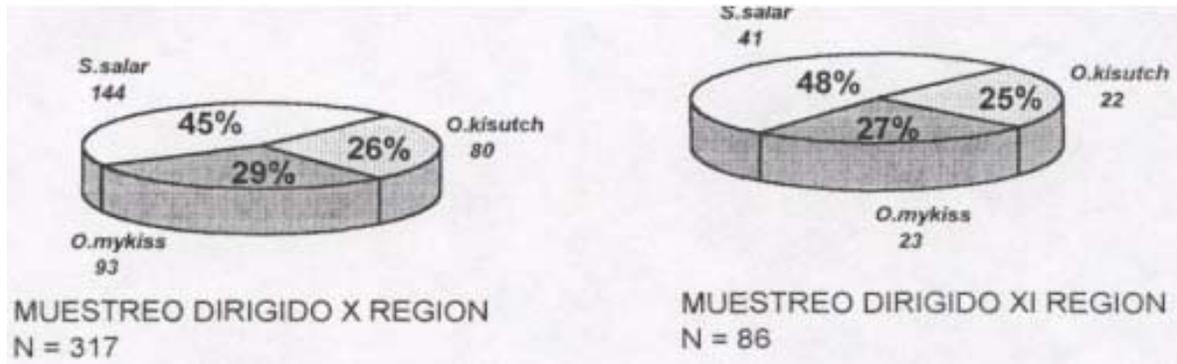


GRAFICO N° 1: Total de peces examinados, según especie y región estudiadas.

#### 4.1.3 MATERIAL DE LABORATORIO

Para realizar este estudio se utilizó la implementación del laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, lo cual permitió realizar las necropsias, tinciones Gram y Giemsa, microhematocritos, Inmunofluorescencia Indirecta para el Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS) y ELISA para la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD). Para realizar el estudio histológico las muestras fueron enviadas al laboratorio de Anatomía Patológica del Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, y las muestras para el estudio de microscopía electrónica fueron preparadas y observadas en el Instituto de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

#### 4.2 METODO

##### 4.2.1 OBTENCION DE MUESTRAS

En cada centro de cultivo visitado se realizaron muestreos dirigidos (peces orillados, oscuros y moribundos) de 10-15 peces por especie, los cuales fueron eutanasiados por asfixia. Posteriormente fueron examinados y procesados en terreno obteniendo muestras de tejidos y órganos para ser analizados en el laboratorio de la Unidad de Ictiopatología del Instituto de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. Todos los peces fueron identificados individualmente así también las muestras obtenidas de cada uno de ellos.

## **4.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

### **4.2.2.1 EXAMEN CLINICO EXTERNO**

Cada pez muestreado fue pesado, medido y examinado clínicamente mediante inspección directa describiendo macroscópicamente las alteraciones externas de piel, aletas, ojos y branquias de acuerdo a un protocolo diseñado para almacenar individualmente esta información (Anexo N° 1).

### **4.2.2.2 EXAMEN CLINICO INTERNO**

Finalizado el examen externo de los peces se procedió a realizar la necropsia de acuerdo al **Fish Health Blue Book** (Amos, 1985) y el **Nordic Manual for the Surveillance and Diagnosis of Diseases in Farmed Salmonids** (Midtlyng y col., 1992), y mediante una minuciosa observación de cada órgano de la cavidad abdominal (hígado, bazo, riñón, estómago, intestino, vejiga natatoria, órganos de la reproducción, vesícula biliar, grasa perivisceral y musculatura) se procedió a describir en forma macroscópica las alteraciones presentadas, para luego registrar individualmente la información en un protocolo diseñado para tal efecto (Anexo N° 2).

### **4.2.2.3 ESTUDIO SANGUINEO**

De cada pez muestreado se obtuvo sangre por punción de la vena caudal, la cual fue colectada en tubos de microhematocritos heparinizados y luego fueron centrifugados durante 5 minutos a 12.000 rpm., para posteriormente realizar la lectura de cada minitubo utilizando una tabla para obtener el porcentaje de volumen globular aglomerado (VGA) y el grosor de la Capa Flogística, considerando como peces anémicos a aquellos que presentaron un VGA < 34 % (Stoskopf, 1993) y la C. Flogística de cada pez fue medida utilizando el rayado de la tabla de lectura de hematocrito obteniendo una apreciación indirecta del número de leucocitos totales, considerando un valor dado para animales domésticos en que una raya equivale aproximadamente a 8.000 leucocitos/mi (Wittwer y Bóhmwald, 1983).

Posteriormente se realizaron frotis sanguíneos sobre portaobjetos los cuales fueron fijados con metanol durante 5 minutos y luego teñidos utilizando la tinción Giemsa y observados al microscopio óptico a través de objetivo 100x con la finalidad de diferenciar el componente celular para definir la presencia de una Leucocitosis y/o Linfoblastosis y además determinar la presencia de esporas intranucleares.

### **4.2.2.4 TINCIONES DE GRAM Y GIEMSA**

De cada ejemplar muestreado se realizaron frotis e improntes en duplicado de tejido hepático, esplénico, renal hematopoyético, cardíaco y cerebral sobre portaobjetos, los cuales fueron fijados al calor y con metanol y posteriormente teñidos utilizando las tinciones de Gram y Giemsa respectivamente. Luego fueron observados al microscopio óptico con objetivo

100x con la finalidad de determinar la presencia de células linfoblásticas a nivel de órganos y de esporas gram positivas intranucleares en dichas células.

#### 4.2.2.5 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

De aquellos peces que clínicamente evidenciaban signología que hacía sospechar de una **Leucosis Linfoblástica (L. Linfoblástica)**, se procedió a realizar toma de muestras para estudio histológico obteniendo trozos de tejido hepático, esplénico, renal hematopoyético, ocular y gonadal, los cuales fueron fijados en formalina bufferizada al 10 %. Posteriormente se seleccionaron las muestras de aquellos peces que de acuerdo a información obtenida en análisis clínicos de laboratorio realizados previamente indicaban una posible **L. Linfoblástica**, para lo cual el procedimiento utilizado fue el siguiente: las muestras seleccionadas provinieron de aquellos peces que evidenciaron la mayor cantidad de hallazgos relacionados con **L. Linfoblástica**, principalmente presencia de esporas intranucleares, linfoblastos en órganos y en sangre, anemia y/o signos clínicos externos e internos de relevancia diagnóstica para la enfermedad, basado en los antecedentes entregados por Kent y col. (1990). Estas muestras seleccionadas fueron procesadas en autotécnico y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H/E) y luego fueron sometidas a estudio histológico con la finalidad de obtener un diagnóstico confirmativo de **L. Linfoblástica**.

#### 4.2.2.6 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFAT)

Para obtener un diagnóstico diferencial de **L. Linfoblástica** con el Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS), se realizaron frotis de tejido hepático, esplénico y renal de aquellos peces de cada especie que clínicamente evidenciaban signología que hacía sospechar de una **L. Linfoblástica**. Luego las preparaciones fueron fijadas con acetona durante 5 minutos y posteriormente se seleccionaron aquellas preparaciones provenientes de los peces que al estudio histológico presentaron **L. Linfoblástica**. Estas preparaciones fueron analizadas a través del test de anticuerpos fluorescentes indirecto (IFAT) policlonal basado en la metodología descrita por Lannan y col. (1991) (Anexo N° 4), con la finalidad de confirmar o descartar la presencia de *Piscirickettsia salmonis*, agente etiológico de SRS.

Para definir la presencia de infección en IFAT/SRS, se determinó positividad cuando se detectaron dos o más organismos rickettsiales en 50 campos microscópicos.

#### 4.2.2.7 TEST DE ABSORCION INMUNOENZIMATICA (ELISA)

Para realizar un diagnóstico diferencial de **L. Linfoblástica** con la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), se obtuvo 1 g. de tejido renal de aquellos peces de cada especie que evidenciaban signología clínica de **L. Linfoblástica**. Estos trozos de tejido fueron conservados en congelación y posteriormente se seleccionaron aquellas muestras provenientes de los peces positivos a **L. Linfoblástica**, las cuales fueron procesadas y analizadas mediante la técnica de ELISA, utilizando el kits comercial de laboratorio K-Dtect (DiagXotics Inc.) basado en el uso de anticuerpos monoclonales p57, desarrollado según la metodología de

Rockey y col. (1991) (Anexo N° 5), lo cual permitió obtener un diagnóstico confirmativo de BKD, considerando positividad una concentración mayor a 10 ng./ ml de antígeno p57.

#### **4.2.2.8 MICROSCOPIA ELECTRONICA**

De aquellos ejemplares que evidenciaban signología clínica sospechosa de **L. Linfoblástica** se procedió a realizar toma de muestras de tejido hepático, esplénico y renal, obteniendo trozos de 1 mm<sup>2</sup> de cada órgano, los cuales fueron fijados en glutaraldehído bufferizado al 2.5 %. Posteriormente se seleccionaron aquellas muestras provenientes de peces que al examen histológico arrojaron diagnóstico positivo a **L. Linfoblástica**. Estas muestras fueron procesadas, preparadas y luego observadas mediante microscopía electrónica de transmisión, con la finalidad de identificar el o los agentes involucrados en la etiología de la enfermedad estudiada.

#### **4.2.2.9 ESTUDIO DE PREVALENCIA**

La prevalencia, expresada en porcentaje de peces positivos histológicamente a **L. Linfoblástica**, fue calculada en base al total de peces muestreados en forma dirigida y también para cada especie y para cada región estudiada.

#### **4.2.2.10 ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE L. LINFOBLASTICA, SRS Y BKD**

Para determinar si existió o no asociación entre **L. Linfoblástica** y SRS o BKD, se consideraron los diagnósticos confirmativos de cada patología, los cuales fueron analizados para cada especie estudiada mediante un análisis estadístico descriptivo empleando Tablas de frecuencias. Para ello, se consideró el número de peces que presentaron simultáneamente la presencia de **L. Linfoblástica** con alguna de las patologías diagnosticadas.

#### **4.2.2.11 ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE L. LINFOBLASTICA**

La distribución geográfica de **L. Linfoblástica** se determinó utilizando elementos de la estadística descriptiva, específicamente relaciones entre variables, en las cuales se analizaron los diagnósticos confirmativos de la enfermedad para cada especie, zona y región estudiadas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ESTUDIO CLINICO

El muestreo de 403 peces se realizó en forma dirigida y al momento de ser muestreados todos ellos se observaron nadando superficialmente, letárgicos y con la piel oscura.

En las Tablas N° 2 y 3 se presentan las alteraciones anatomopatológicas externas e internas observadas con mayor frecuencia en el total de los salmones muestreados y para cada especie estudiada.

TABLA N° 2 : Alteraciones anatomopatológicas externas observadas en el total de los salmones muestreados en forma dirigida para cada especie estudiada, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Alteración Anatomopatológica Externa	Especies muestreadas en forma dirigida							
	<i>O. kisutch</i> N = 102		<i>O. mykiss</i> N = 116		<i>S. salar</i> N = 185		TOTAL N = 403	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hemorragias cutáneas	7	6.9	16	13.8	13	7.0	36	8.9
Ulceras cutáneas	12	11.8	8	6.9	10	5.4	30	7.4
Abultamiento abdominal	22	21.6	13	11.2	-	-	35	8.7
Hemorragias en base de aletas	8	7.8	39	33.6	18	9.7	65	16.1
Exoftalmia bilateral	13	12.7	5	4.3	5	2.7	23	5.7
Hemorragia periocular bilateral	12	11.8	6	5.2	13	7.0	31	7.7
Hemorragia retrobulbar bilateral	9	8.8	5	4.3	23	12.4	37	9.2
Opacidad ocular bilateral	-	-	1	0.9	15	8.1	16	4.0
Palidez branquial	51	50.0	50	43.1	55	29.7	156	38.7

-: no existe lesión

Se puede observar que el 38.7 % de los peces muestreados presentan palidez branquial y 16.1 % presenta hemorragias en la base de las aletas. A nivel ocular se observó hemorragia retrobulbar bilateralmente en un 9.2 %, exoftalmia bilateral en un 5.7 % y a nivel cutáneo se observaron hemorragias petequiales en un 8.9 % y abultamiento abdominal en un 8.7 % de los peces muestreados.

TABLA N° 3 : Alteraciones anatomopatológicas internas observadas en el total de los peces muestreados en forma dirigida para cada especie estudiada, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Alteración Anatomopatológica Interna	Especies muestreadas en forma dirigida							
	<i>O. kisutch</i> N = 102		<i>O. mykiss</i> N = 116		<i>S. salar</i> N = 185		TOTAL N = 403	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ascitis serosanguinolenta	8	7.8	5	4.3	18	9.7	31	7.7
Hepatomegalia	14	13.7	7	6.0	9	4.9	30	7.4
Esplenomegalia	50	49.0	40	34.5	33	17.8	123	30.5
Renomegalia	38	37.3	33	28.4	32	17.3	103	25.6
Estómago con líquido	22	21.6	13	11.2	-	-	35	8.7
Pared intestinal engrosada	8	7.8	7	6.0	16	8.6	31	7.7
Hemorragias en gónadas	3	2.9	1	0.9	1	0.5	5	1.2
Hemorragias en grasa visceral	14	13.7	20	17.2	14	7.6	48	11.9
Palidez hepática	43	42.2	30	25.9	54	29.2	127	31.5

-.: no existe lesión.

Dentro de las alteraciones anatomopatológicas internas se evidenció palidez hepática en un 31.5 %, esplenomegalia en un 30.5 %, renomegalia en un 25.6 %, hemorragias en grasa visceral en un 11.9 %, estómago con abundante cantidad de líquido en un 8.7 % y ascitis serosanguinolenta y pared intestinal engrosada en un 7.7 % de los peces muestreados, respectivamente.

## 5.2 ESTUDIO SANGUINEO Y TINCIONES GRAM Y GIEMSA

Los resultados del estudio sanguíneo y de las tinciones de Gram y Giemsa en frotis de tejidos e improntes de órganos hematopoyéticos y no hematopoyéticos, realizados en salmones muestreados en forma dirigida en la X región para cada especie estudiada, se presentan en la siguiente Tabla:

TABLA N° 4 : Hallazgos relacionados con Leucosis Linfoblástica diagnosticados a través del estudio sanguíneo y de tinciones de Gram y Giemsa, realizados en salmones muestreados dirigidamente según especie estudiada en la X región, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Hallazgos relacionados con Leucosis Linfoblástica	X REGION							
	<i>O. kisutch</i> N = 80		<i>O. mykiss</i> N = 93		<i>S. salar</i> N = 144		TOTAL N = 317	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Anemia	28	35.0	32	34.4	39	27.1	99	31.2
C. Flogística $\geq$ 2 rayas	25	31.3	21	22.6	39	27.1	85	26.8
Leucocitosis	16	20.0	13	14.0	30	20.8	59	18.6
Linfoblastosis	8	10.0	10	10.8	17	11.8	35	11.0
Linfoblastos en órganos	5	6.3	4	4.3	7	4.9	16	5.0
Esporas Gram (+) IN	3	3.8	5	5.4	1	0.7	9	2.8

Esporas Gram (+) IN : Esporas gram positivas intranucleares.

De los peces muestreados en la X región, el 31.2 % de ellos presentó anemia y 26.8 % presentó niveles de la Capa Flogística  $\geq$  2 rayas. Al realizar la diferenciación entre Linfoblastosis y Leucocitosis, se observó que 18.6 % de los salmones presentaron Leucocitosis y 11.0 % Linfoblastosis y la presencia de linfoblastos y esporas gram positivas intranucleares en los tejidos y órganos analizados se encontró en un 5.0 % y 2.8 % del total de los salmones muestreados en la región, respectivamente.

Los resultados del estudio sanguíneo y de tinciones de Gram y Giemsa realizados en tejidos y órganos de los salmones muestreados en la XI región para cada especie, se observan en la Tabla N° 5.

TABLA N° 5 : Hallazgos relacionados con Leucosis Linfoblástica diagnosticados a través del estudio sanguíneo y de tinciones Gram y Giemsa realizados en salmones muestreados dirigidamente, según especie estudiada en la XI región, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Hallazgos relacionados con Leucosis Linfoblástica	XI REGION							
	<i>O. kisutch</i> N = 22		<i>O. mykiss</i> N = 23		<i>S. salar</i> N = 41		TOTAL N = 86	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Anemia	6	27.3	14	60.9	13	31.7	33	28.4
C. Flogística ≥ 2 rayas	1	4.5	1	4.3	2	4.9	4	4.7
Leucocitosis	2	9.1	1	4.3	0	7.3	6	7.0
Linfoblastosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfoblastos en órganos	1	4.5	0	0	0	0	1	1.2
Esporas Gram (+) IN	0	0	0	0	0	0	0	0

Esporas Gram (+) IN : Esporas gram positivas intranucleares.

De esta Tabla se desprende que del total de peces muestreados en la XI región, 28.4 % de ellos presentó anemia, un 7.0 % presentó Leucocitosis y 4.7 % presentó niveles de la Capa Flogística ≥ 2 rayas. La presencia de linfoblastos en los órganos analizados se observó en un pez (1.2 %), el cual correspondió a la especie *O. kisutch*.

Por otra parte, se destaca que no se observaron peces con Linfoblastosis y/o esporas gram positivas intranucleares.

En el Gráfico N° 2 se presentan los resultados generales del estudio sanguíneo y de tinciones Gram y Giemsa, realizados en el total de los salmones muestreados tanto en la X como en la XI regiones y para cada especie estudiada.

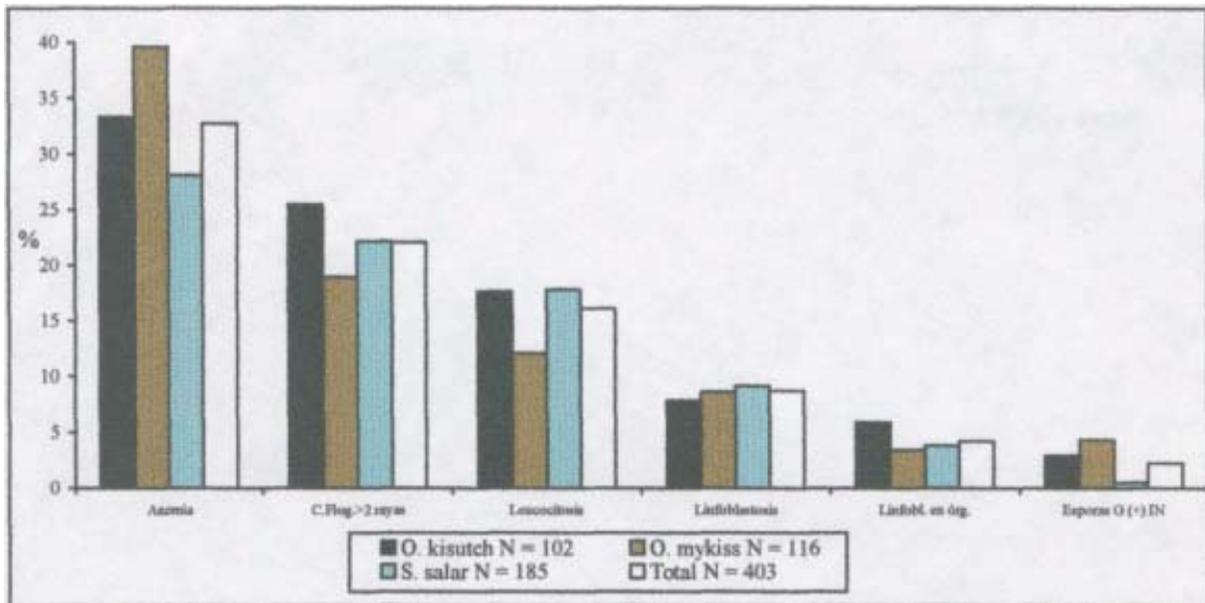


GRAFICO N° 2 : Hallazgos relacionados con **Leucosis Linfoblástica** diagnosticados a través del estudio sanguíneo y de tinciones Gram y Giemsa, realizados en salmones muestreados dirigidamente según especie estudiada en la X + XI región, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Del Gráfico N° 2 se desprende que un 32.8 % del total de peces muestreados presentó anemia (VGA < 34 %) y un 22.1 % presentó un grosor de la Capa Flogística  $\geq 2$  rayas. Al realizar el reconocimiento del tipo celular presente en los frotis sanguíneos se observó que 16.1 % de los peces evidenciaron Leucocitosis y 8.7 % presentó Linfoblastosis (Fig. N°1) y el análisis de frotis sanguíneos e improntes de órganos teñidos con Giemsa y Gram demostró la presencia de linfoblastos en 4.2 % y esporas gram positivas intranucleares (Fig. N° 2 y Fig. N° 3) en 2.2 % del total de peces muestreados en ambas regiones estudiadas.

La situación por especie demostró la presencia de anemia en 39.7 % del total de peces de la especie *O. mykiss* y en 33.3 % de *O. kisutch*. La presencia de Linfoblastosis se observó en 5.9 % de los peces *O. kisutch*, en 3.8 % de *S. salar* y en 3.4 % de *O. mykiss* y la presencia de esporas gram positivas intranucleares se observó en 4.3 % de los peces *de O. mykiss*, en 2.9 % de *O. kisutch* y en 0.5 % de *S. salar*.

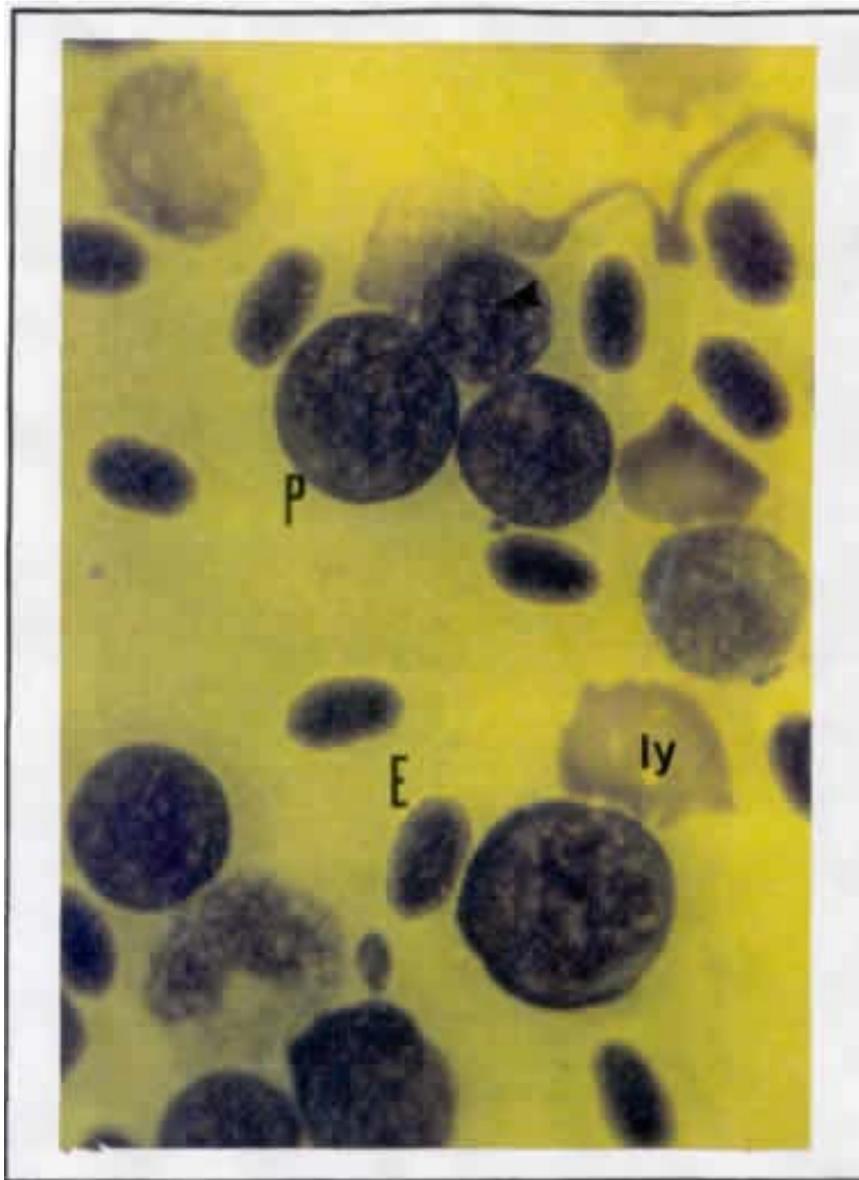


FIGURA N° 1 : *O. kisutch*. Frotis sanguíneo que demuestra proliferación de linfoblastos (P). Inclusiones intranucleares (Cabeza de flecha), Eritrocitos (E), Eritrocitos usados (ly). (Giemsa, 1280 x).



FIGURA N° 2 : *O. mykiss*. Imprime de hígado mostrando una célula infectada con 16 esporas intranucleares (MS). (Gram, 1.114 x)

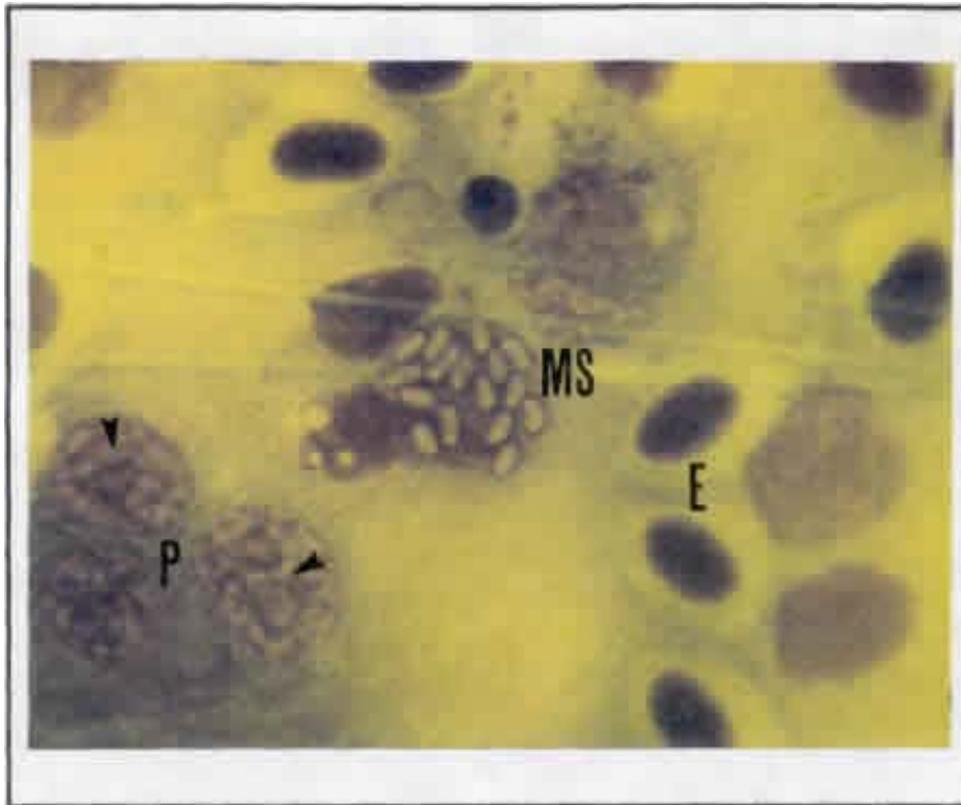


FIGURA N° 3 : *Salmo salar*. Frotis sanguíneo mostrando una célula infectada con 16 esporas intranucleares (MS). Eritrocitos (E), Linfoblastos (P), Inclusiones intranucleares (Cabeza de flecha). (Giemsa, 1280 x).

### 5.3 ESTUDIO HISTOLOGICO

Cada uno de los parámetros observados anteriormente permitió seleccionar los peces para analizarlos a través del estudio histológico, para obtener un diagnóstico confirmativo de **Leucosis Linfoblástica** en los salmones muestreados en forma dirigida de cada especie estudiada. Estos resultados se presentan en la Tabla N° 6.

TABLA N° 6 : Diagnóstico de **Leucosis Linfoblástica** realizado mediante análisis histológico en salmones seleccionados previamente y provenientes de un muestreo dirigido, según especie y región estudiadas, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

REGIONES MUESTREADAS	<i>O. kisutch</i>			<i>O. mykiss</i>			<i>S. salar</i>			TOTAL		
	N° Peces Examin.	N° Peces Positivos	%	N° Peces Examin.	N° Peces Positivos	%	N° Peces Examin.	N° Peces Positivos	%	N° Peces Examin.	N° Peces Positivos	%
X	9	7	77.8	10	7	70.0	11	1	9.1	30	15	50.0
XI	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	0
X + XI	10	7	70.0	11	7	63.6	12	1	8.3	33	15	45.5

De la Tabla N° 6 se desprende que de los 33 salmones seleccionados para ser analizados histológicamente, 45.5 % de ellos resultó con diagnóstico positivo a **L. Linfoblástica**. En la X región se analizaron 30 peces, resultando 50.0 % positivos y en la XI región fue necesario analizar 3 peces (uno de cada especie) los cuales resultaron negativos.

Respecto al total de peces analizados por especie, *O. kisutch* y *O. mykiss* presentaron 70.0 % y 63.6 % de positividad, respectivamente; y en *S. salar* se observó un caso positivo (8.3 %).

Histológicamente el cuadro de **L. Linfoblástica** se caracterizó por la presencia de infiltrado de células linfoblásticas a nivel de riñón anterior, hígado, bazo y gónadas. Las células linfoblásticas inmaduras se caracterizaron por presentar pleomorfismo, escaso citoplasma, diferentes tamaños, nucléolos prominentes y algunas de ellas con cuerpos de inclusión intranucleares y un alto porcentaje de figuras mitóticas (Fig. N° 4).

La prevalencia de **Leucosis Linfoblástica** fue calculada en base al total de salmones muestreados en forma dirigida en cada región y para cada especie estudiada, basado en los resultados obtenidos en el análisis histológico, los cuales se presentan en la siguiente Tabla:

TABLA N° 7 : Prevalencia (%) de **Leucosis Linfoblástica** en salmones muestreados en forma dirigida, según especie y región estudiadas, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

REGIONES	Especies muestreadas en forma dirigida											
	<i>O. kisutch</i>			<i>O. mykiss</i>			<i>S. salar</i>			TOTAL		
	N	n	%	N	n	%	N	n	%	N	n	%
X	80	7	8.8	93	7	7.5	144	1	0.7	317	15	4.7
XI	22	0	0	23	0	0	41	0	0	86	0	0
X + XI	102	7	6.9	116	7	6.0	185	1	0.5	403	15	3.7

Se puede observar que la prevalencia general de **L. Linfoblástica** fue de 3.7 %.

Se puede observar que la prevalencia general de **L. Linfoblástica** fue de 3.7 %. En la X región se registró una prevalencia de 4.7 % y en la XI región no se observaron casos positivos. La situación por especie reflejó en **O. kisutch** y **O. mykiss** una prevalencia de 6.9 % y 6.0 %, respectivamente, y en **S. salar** fue de 0.5 %.



FIGURA N° 4: **O. mykiss**. Corte histológico de hígado mostrando infiltración de células linfoblásticas alrededor de un vaso sanguíneo (entre flechas) (Hematoxilina Eosina). (120x).

En la siguiente Tabla se presentan las alteraciones anatomopatológicas externas e internas observadas en los peces que presentaron diagnóstico positivo a **L. Linfoblástica** y sin la presencia de SRS y BKD.

TABLA N° 8 : Alteraciones anatomopatológicas externas e internas observadas en los peces que solamente presentaron L. Linfoblástica mediante análisis histológico y que fueron muestreados en forma dirigida entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Alteraciones Anatomopatológicas	N = 7	
	n	%
Piel oscura	7	100.0
Palidez branquial	4	57.1
Exoftalmia bilateral	2	28.6
Abdomen abultado	4	57.1
Palidez branquial + Exoft. bilateral	1	14.3
Esplenomegalia	6	85.7
Renomegalia	6	85.7
Espleno-renomegalia	5	71.4
Estómago con líquido	4	57.1
Pared intestinal engrosada	1	14.3
Palidez hepática	4	57.1

De la Tabla N° 8 se desprende que todos los peces con diagnóstico de **L. Linfoblástica** presentaron la piel oscura y 57.1 % presentó palidez branquial. Abultamiento abdominal se observó en 57.1 % y exoftalmia bilateral se presentó en 28.6 % de estos peces. Internamente, se evidenció esplenomegalia y renomegalia en 85.7 % respectivamente, y la presencia simultánea de espleno-renomegalia se observó en 71.4 % de los peces con **L. Linfoblástica**. Un 57.1 % de los peces presentó el estómago con abundante cantidad de líquido y palidez hepática, respectivamente.

#### 5.4 DIAGNOSTICO DE SRS Y BKD UTILIZANDO LAS TECNICAS DE IFAT Y ELISA, RESPECTIVAMENTE

Para obtener un diagnóstico diferencial entre **L. Linfoblástica**, **SRS** (Síndrome Rickettsial Salmonídeo) y **BKD** (Enfermedad Bacteriana del Riñón), los salmones analizados histológicamente también fueron analizados a través de las técnicas de **IFAT** para diagnosticar **SRS** y de **ELISA** para diagnosticar **BKD**. Estos resultados se presentan en la Tabla N° 9.

TABLA N° 9 : Diagnóstico de **SRS** y **BKD** mediante **IFAT** y **ELISA**, respectivamente, en salmones que fueron analizados a través de histología para diagnosticar **Leucosis Linfoblástica**, según especies estudiadas.

PRUEBAS	Especies analizadas									TOTAL		
	<i>O. kisutch</i>			<i>O. mykiss</i>			<i>S. salar</i>					
	N	n	%	N	n	%	N	n	%	N	n	%
IFAT/SRS	10	5	50.0	11	4	36.4	12	3	25.0	33	12	36.4
ELISA/BKD	10	3	30.0	11	2	18.2	12	1	8.3	3	6	18.2

N : número de peces examinados, n : número de peces positivos.

Estos resultados demostraron que de los 33 peces analizados histológicamente, 12 de ellos (36.4 %) resultaron positivos al análisis de **IFAT/SRS** y 6 (18.2 %) resultaron positivos al análisis de **ELISA/BKD**. Esto permitió determinar el nivel de asociación entre **L. Linfoblástica** y estas patologías diagnosticadas, lo cual se presenta en la Tabla N° 11.

## 5.5 ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE LEUCOSIS LINFOBLASTICA Y OTROS DIAGNOSTICOS REALIZADOS

En la Tabla N° 10 se presentan los hallazgos de laboratorio observados en los peces que presentaron diagnóstico positivo de **L. Linfoblástica** para cada especie estudiada.

TABLA N° 10 : Hallazgos de laboratorio observados en los peces con diagnóstico de **L. Linfoblástica** para cada especie muestreada en forma dirigida, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Hallazgos de Laboratorio asociados a <b>L. Linfoblástica</b>	Especies estudiadas				
	<i>O. kisutch</i> N = 7	<i>O. mykiss</i> N = 7	<i>S. salar</i> N=1	TOTAL N=15	
	n	n	n	n	%
Anemia	2	5	1	8	53.3
Capa Flogística ≥ 2 rayas	4	4	0	8	53.3
Leucocitosis	4	4	0	8	53.3
Linfoblastosis	0	1	0	1	6.7
Linfoblastos en órganos	7	6	1	14	93.3
Esporas gram (+) intranucleares	1	1	1	3	20.0

De la Tabla N° 10 se desprende que de los peces con diagnóstico de **L. Linfoblástica** un 93.3 % evidenció la presencia de linfoblastos en los órganos analizados. La presencia de anemia, Capa Flogística ≥ 2 rayas y Leucocitosis se evidenció en un 53.3 % para estos hallazgos, la presencia de esporas gram positivas intranucleares se observó en un 20.0 % y la Linfoblastosis se observó en 6.7 % de los peces afectados por la enfermedad.

Los niveles de asociación observados entre **L. Linfooblástica**, SRS y BKD en los salmones analizados se presentan en la siguiente Tabla:

TABLA N° 11 : Nivel de asociación entre **L. Linfooblástica**, SRS y BKD determinado en los salmones positivos a **L. Linfooblástica**, según especie muestreada entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Enfermedades asociadas a <b>L. Linfooblástica</b>	Especies estudiadas							
	<i>O. kisutch</i> N = 7		<i>O. mykiss</i> N = 7		<i>S. salar</i> N = 1		TOTAL N = 15	
	n	%	n	%	n	%	n	%
SRS	3	42.9	3	42.9	1	100.0	7	46.7
BKD	3	42.9	0	0	1	100.0	4	26.7

En la Tabla N° 11 se puede observar que de los 15 peces con diagnóstico positivo de **L. Linfooblástica** 7 de ellos (46.7 %) tenían SRS, 4 (26.7 %) tenían BKD y 3 (20.0 %) tenían simultáneamente la presencia de las 3 patologías.

Se destaca que el único caso positivo a **L. Linfooblástica** de la especie *S. salar* presentó las 3 patologías simultáneamente, y un 28.6 % de los peces *O. kisutch* también presentaron las 3 patologías simultáneamente, situación que no se da en *O. mykiss*.

Del total de peces positivos a **L. Linfooblástica** hubo 7 peces (1.7% del total de peces muestreados) que no presentaron SRS ni BKD y de éstos, 3 correspondieron a la especie *O. kisutch* y 4 a *O. mykiss*.

## 5.6 ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Con el objetivo de lograr identificar el o los agentes involucrados en la etiología de **L. Linfooblástica**, se observaron muestras provenientes de peces positivos a esta patología a través de microscopía electrónica de transmisión.

La Figura N° 5 corresponde a una fotografía de microscopía electrónica la cual reveló que las esporas gram positivas intranucleares observadas en algunos peces corresponden a la fase madura del parásito microsporídeo *Enterocytozoon (Nucleospora) salmonis*.



FIGURA N° 5: *O.Kisutch*. Microspía electrónica de transmisión mostrando la presencia de esporas maduras de *Enterocytozoon (Nucleospora) salmonis* dentro del núcleo de una célula huésped. (Bar = 1 um).

En la fotografía se observa la forma ovoide que presentan las esporas maduras de *E. (Nucleospora) salmonis* con un tamaño de 1 x 2  $\mu\text{m}$ . En la sección de las esporas se evidencia una exospora y en el interior la presencia del tubo polar enrollado alrededor del esporoplasma.

En algunas muestras de peces con *L. Linfoblástica* se observaron partículas virales que sugieren la presencia de retrovirus formando cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en células linfoblásticas. Estas partículas de aproximadamente 100 nm de diámetro se caracterizaron por presentar una forma aproximadamente circular con un core denso y definido (Fig. N° 6).

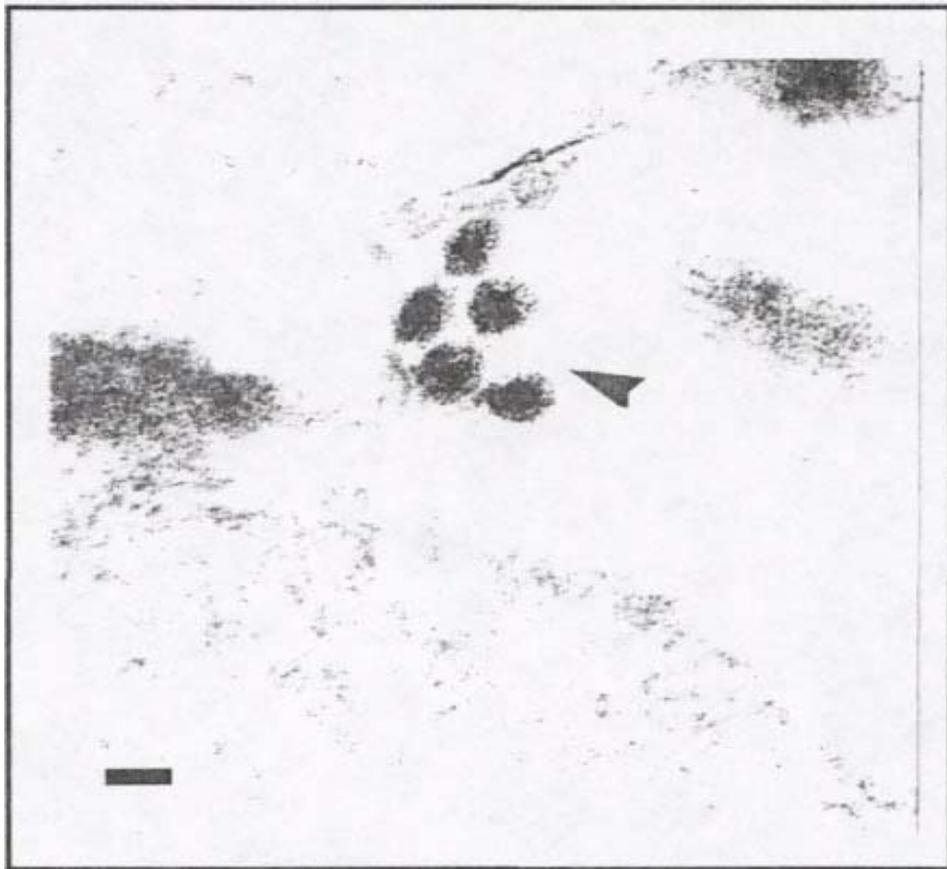


FIGURA N° 6 : **O. kisutch**. Microscopía electrónica de transmisión mostrando la presencia de partículas virales con un core denso asociadas a una célula linfoblástica. (77.820 x) (Bar = 100nm).

## 5.7 ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE L. LINFOBLASTICA

En el Gráfico N° 3 se presenta la distribución geográfica de los casos positivos a **L. Linfoblástica** para cada especie, zona y región estudiadas.

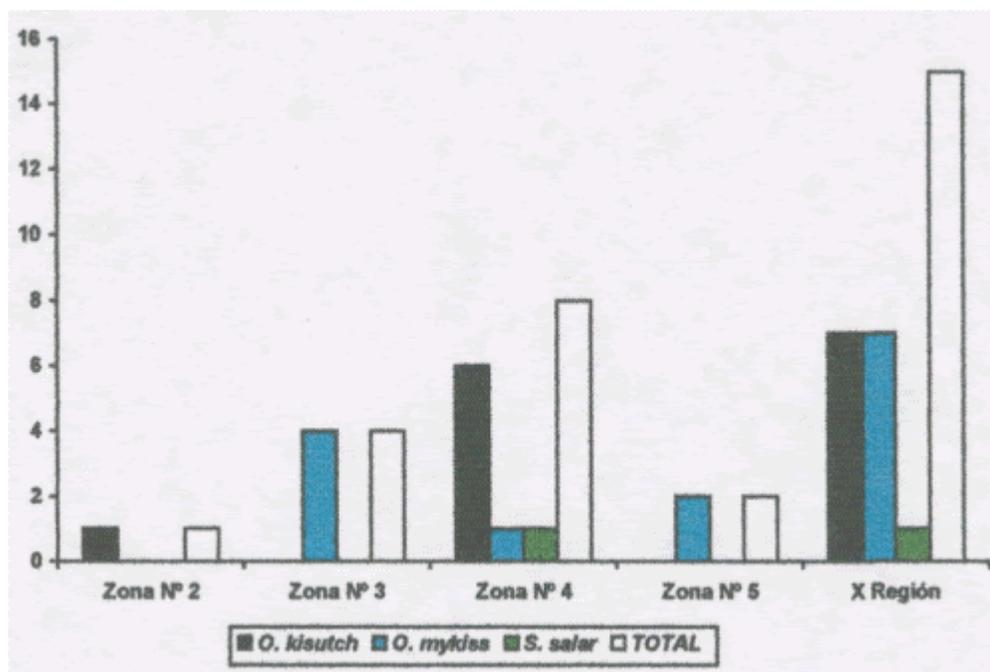


GRAFICO N° 3 : Distribución geográfica de los casos positivos a **Leucosis Linfoblástica** según especie, zona y región estudiadas, entre Octubre de 1995 y Enero de 1996.

Todos los casos positivos a **L. Linfoblástica** se diagnosticaron en la X región, específicamente en las zonas N° 2,3,4, y 5, y el 53.3 % de los casos positivos se observaron en la zona N° 4 (Chiloé Insular Norte) y N° 5 (Chiloé Insular Sur) en donde se registraron el 26.7 % y 13.3 % de los casos positivos, respectivamente. Y en la zona N° 2 (F. Reloncaví - Ralún) se presentó el 6.7 % de los casos observados.

La situación por especies reflejó que los casos positivos de ***O. kisutch*** se presentaron en las zonas N° 2 y 4; y los casos de ***O. mykiss*** se observaron en la zona N° 3,4 y 5. El único caso de la especie ***S. salar*** se observó en la zona N° 4.

## 6. DISCUSION

El gran desarrollo e intensificación logrado por la salmonicultura nacional ha provocado un aumento de los problemas ocasionados por enfermedades (Bustos, 1991), existiendo por ello un permanente riesgo de aparición y diseminación de enfermedades infecto-contagiosas, favorecido por el sostenido aumento de la importación de ovas (Cassigoli, 1995; Mardones y col., 1995). El potencial productivo y la rentabilidad comercial de la industria acuícola están íntimamente ligadas a los aspectos sanitarios y el hallazgo de nuevas enfermedades como la **Leucosis Linfoblástica** pueden ocasionar pérdidas importantes en la salmonicultura nacional, pudiendo desestabilizar el desarrollo sustentable de la actividad.

Al observar los resultados obtenidos en esta investigación se puede advertir que el 100 % de los peces muestreados se observaron nadando superficialmente, letárgicos y con la piel oscura, signos que son comunes a muchas enfermedades, pero también concuerda con lo descrito para una enfermedad observada en poblaciones de salmón chinook (*O. tshawytscha*) cultivados en forma intensiva en Canadá y Estados Unidos diagnosticada como "**Leucemia Plasmacitoídea**" (Kent y col., 1990; Morrison y col., 1990; Newbound y Kent, 1991 a).

Las Tablas N° 2 y 3 muestran las diferentes alteraciones anatomopatológicas identificadas en el total de peces muestreados en ambas regiones para cada especie estudiada. Externamente el signo que se observó con mayor frecuencia fue la palidez branquial (38.7 %) lo que estaría indicando la presencia de anemia en estos peces (Kent y col., 1990; Newbound y Kent, 1991 a; Stoskopf, 1993) concordando en parte con el 32.8 % de anemia observado en el total de peces y también con lo observado en cada especie (Gráfico N° 2). Esta diferencia podría suponer que no todos los peces que tienen palidez branquial padecerían una condición anémica o también se debería a la subjetividad en el reconocimiento de la palidez branquial y al rápido cambio de coloración post-mortem que se observa en las branquias, sin embargo, en los peces con diagnóstico de **L. Linfoblástica** se observó que todos los peces que presentaron palidez branquial también evidenciaron algún grado de anemia (Tablas N° 8 y 10) suponiendo con ello que la palidez branquial fue un reflejo de la condición anémica y la presencia de estos signos sugiere la posible presencia de **L. Plasmacitoídea** debido a que son signos característicos de esta enfermedad (Hedrick y col., 1990; Morrison y col., 1990; Newbound y Kent, 1991 a).

Otro signo externo observado con bastante frecuencia fue la presencia de hemorragias en la base de las aletas, pero no fue observado en los peces con **L. Linfoblástica**, lo cual sugiere que podría estar relacionado con enfermedades de carácter septicémico (Stoskopf, 1993).

Un signo externo característico de **L. Plasmacitoídea** es la presencia de exoftalmia bilateral (Morrison y col., 1990; Newbound y Kent, 1991 a) el cual fue observado en el 5.7 % del total de peces principalmente en *O. kisutch*, pero en los peces con **L. Linfoblástica** se observó solo en el 28.6 % de ellos, lo cual indica que este signo está asociado ocasionalmente con la enfermedad, concordando con resultados de Kent y col. (1990) quienes

obtuvieron aproximadamente un 20.0 % de exoftalmia bilateral en peces con **L. Plasmacitoídea** sosteniendo que la presencia de esta alteración anatomopatológica revelaría una masiva acumulación de infiltrado neoplásico en la órbita ocular.

La presencia simultánea de exoftalmia bilateral y palidez branquial en los peces con **L. Linfoblástica** se observó solo en el 14.3 % de ellos, lo cual sería atribuido probablemente a la escasa presentación de la alteración ocular exhibida por estos peces y a que no siempre estarían asociados.

Otra alteración externa en los peces con **L. Linfoblástica** es la presencia de abultamiento abdominal presentándose en el 27.1 % de ellos (Tabla N° 8), aunque en la totalidad de los peces muestreados solo se observó en el 8.7 % y solo en las especies **O. kisutch** y **O. mykiss**, lo cual indicaría que podría estar asociado a la enfermedad. Al abordar internamente estos peces, reveló que esta alteración se debió a la gran acumulación de líquido en la cavidad estomacal, pero no a la presencia de ascitis serosanguinolenta descrito para **L. Plasmacitoídea** por Kent y col. (1990), Morrison y col. (1990) y Newbound y Kent (1991 a), quienes también sostienen que otro signo característico es la presencia de engrosamiento de la pared intestinal, lo cual solo se observó en un caso (14.7 %) de los peces con **L. Linfoblástica** (Tabla N° 8), debido probablemente a una enteritis o a la presencia de infiltrado tumoral en la mucosa intestinal.

Internamente, las alteraciones anatomopatológicas observadas con mayor frecuencia en la totalidad de los peces muestreados fue la presencia de palidez hepática, esplenomegalia y renomegalia (Tabla N° 3), siendo más frecuentes en **O. kisutch** y **O. mykiss**. Esplenomegalia y renomegalia son signos característicos de **L. Plasmacitoídea** (Hedrick y col., 1990; Kent y col., 1990; Morrison y col., 1990; Newbound y Kent, 1991; Eaton y Kent, 1992) lo cual concuerda con lo observado en los peces con diagnóstico de **L. Linfoblástica** (Tabla N° 8) en que los signos internos mayormente asociados a la enfermedad fueron esplenomegalia y renomegalia, pero también se observaron con gran frecuencia la presencia de acumulación de líquido en el estómago y palidez hepática, esto último asociado probablemente a una condición anémica severa en los peces afectados.

En las Tablas N° 4 y 5 y Gráfico N° 3 se observan los diferentes hallazgos diagnosticados a través de exámenes de laboratorio, los cuales permitieron presumir de una condición leucémica en algunos peces. El hallazgo observado con mayor frecuencia fue la presencia de algún grado de anemia, signo que revela la presencia de alguna enfermedad, y al parecer este signo se manifiesta a través de palidez branquial en los peces, sin embargo, solo un 14.9 % de los peces presentaron anemia y palidez branquial simultáneamente, lo cual sugiere que no siempre una condición anémica se refleja en palidez branquial.

Otro hallazgo observado con bastante frecuencia fue la presencia de una Capa Flogística  $\geq 2$  rayas obteniendo con ello una apreciación indirecta del número de leucocitos totales de aproximadamente  $16 \times 10^3$  leucocitos/ml o más, lo que se interpreta como una Leucocitosis, puesto que según Stoskopf (1993) el rango de referencia considerado normal para este parámetro es  $10-15 \times 10^3$  leucocitos/ml. Esta situación fue corroborada en el análisis de

frotis sanguíneos con tinción Giemsa en los cuales se observó una gran cantidad de leucocitos, principalmente linfocitos, sin embargo la presencia simultánea de C. Flogística  $\geq 2$  rayas y Leucocitosis se observó en el 11.2 % del total de peces analizados, lo cual indica que el aumento de la C. Flogística no siempre se debe a una Leucocitosis, sino también a un aumento en la cantidad de trombocitos (Wittwer y Bohmwald, 1983). Además, en este estudio se observó que del 8.7 % de los peces que evidenciaron la presencia de células linfoblásticas circulantes (Linfoblastosis) un 3.7 % de ellos presentó un aumento de la C. Flogística, lo cual indicaría que la presencia de este tipo celular no siempre se manifiesta en aumento de la C. Flogística.

Por otra parte, es importante destacar que la presencia de estas células con características de linfoblastos concuerda con lo descrito por Kent y col. (1990) y Kent y Dawe (1993) para un tipo de células blásticas que ellos denominan "plasmoblastos", las cuales se caracterizan por presentar bordes lisos, escaso citoplasma basofílico, un gran núcleo y una zona que se tiñe escasamente, denominada "yuxtannuclear hof". Este mismo tipo celular se observó en tinciones de Giemsa realizados en órganos viscerales como hígado, bazo y riñón en un 4.2 % del total de peces analizados, principalmente en *O. mykiss* y *O. kisutch* de la X región y su presencia a nivel sanguíneo y visceral probablemente se deba a una condición neoplásica para lo cual se requiere un diagnóstico confirmativo a través de un análisis histológico (Newbound y Kent, 1991 b; Newbound y col., 1995; Stephen y col., 1995). Sin embargo, el criterio histológico puede ser insuficiente para diagnosticar esta patología debido a que es muy difícil diferenciar células linfoblásticas de hemocitoblastos o células mesenquimales no diferenciadas, ya que en algún momento antes de completar la maduración o diferenciación de estas células, todas pueden considerarse como células multipotenciales o blásticas (Schalm y col., 1975; Morrison y col., 1990).

La presencia de esporas gram positivas intranucleares se observó en células con características de linfoblastos solo a nivel de órganos viscerales y se presentó en el 2.2 % de los peces, siendo un hallazgo que no siempre estuvo asociado a la presencia de los otros hallazgos diagnosticados.

La Tabla N° 6 registra los resultados obtenidos luego de realizar el análisis histológico para obtener un diagnóstico confirmativo de **L. Linfoblástica** en los peces que presumiblemente presentaban la enfermedad, y se puede observar que de los 33 peces analizados un 45.5 % de ellos arrojó un diagnóstico positivo de **L. Linfoblástica** y solamente en peces que fueron muestreados en la X Región. Estos resultados permiten sostener que la metodología empleada para obtener un diagnóstico presuntivo de L. Linfoblástica tuvo efectividad principalmente en las especies *O. kisutch* y *O. mykiss* en las cuales se logró un 70.0 % y 63.6 % de efectividad, respectivamente. Por lo tanto, la presentación de hallazgos como la presencia de células linfoblásticas en órganos viscerales y Leucocitosis, utilizando la tinción Giemsa, sumado a ello la presencia de anemia y C. Flogística  $\geq 2$  rayas (Tabla N° 10) hacen posible sospechar de esta enfermedad, principalmente si ellas se presentan en las especies *O. kisutch* y *O. mykiss*.

Un aspecto que llama la atención es lo observado en la especie *S. salar* en la cual se analizó el mayor número de peces y solo se obtuvo un caso positivo a **L. Linfoblástica**

siendo seleccionados bajo el mismo criterio utilizado en las otras especies estudiadas, lo cual probablemente estuvo influenciado por los bajos pesos de estos salmones, ya que el promedio de peso del total de los peces muestreados de *S. salar* fue de 0.61 Kg., en cambio en *O. kisutch* y *O. mykiss* fue de 1.72 Kg. y 1.00 Kg., respectivamente (Anexo N° 3), además el promedio de peso de los peces positivos a **L. Linfoblástica** fue de 1.70 Kg. para *O. kisutch* y 2.30 Kg. para *O. mykiss* y el único caso positivo de *S. salar* pesó 1.00 Kg. y el resto de los peces de esta especie que fueron analizados histológicamente pesaron menos de 1 Kg. Esto concuerda con lo descrito para **L. Plasmacitoídea** por Kent y col. (1990) y Newbound y Kent (1991 a) quienes sostienen que esta enfermedad afecta a peces de aproximadamente 1 Kg. hasta un peso de precosecha, dado el carácter crónico de la enfermedad. Por su parte, Kent y col. (1993) plantean la hipótesis que los peces que se infectan antes de ser introducidos al mar desarrollan clínicamente la enfermedad aproximadamente 6 a 12 meses después de ingresados al mar.

Newbound y Kent (1991 a) sostienen que *O. kisutch* y *O. mykiss* son especies resistentes a **L. Plasmacitoídea**, sin embargo, estos resultados muestran que estas especies son susceptibles a **L. Linfoblástica** naturalmente adquirida.

La caracterización histológica del cuadro de **L. Linfoblástica** con presencia de infiltrado de células linfoblásticas inmaduras a nivel de riñón hematopoyético, hígado, bazo y gónadas, concuerda con lo descrito para el cuadro de "**Leucemia Plasmacitoídea**" o "**Anemia Marina**" reportado desde 1988 en salmón chinook (*O. tshawytscha*) en Canadá y Estados Unidos, el cual se caracteriza histológicamente por una proliferación infiltrativa de "plasmoblastos" en órganos viscerales, tejido retrobulbar, músculo y otros tejidos (Kent y col., 1990; Kent y col., 1991; Newbound y Kent, 1991 a; Eaton y Kent, 1992; Eaton y col., 1993; Kent y Dawe, 1993; Eaton y Kent, 1994; Newbound y col., 1995; Stephen y col., 1995), y los "plasmoblastos" descritos por estos autores corresponden según sus características estructurales a células linfoblásticas concordando con Hedrick y col. (1990) y Hedrick y col. (1991). Dadas las características de inmadurez presentadas por estas células indica que se trataría de un cuadro neoplásico.

Según Stephen y col. (1995), la clasificación de las neoplasias está basada principalmente en el criterio histológico, por lo tanto, de acuerdo a la "Clasificación histológica y nomenclatura internacional de las enfermedades neoplásicas del tejido hematopoyético y linfoide de los animales domésticos" (Jarret y Mackey, 1974), este cuadro corresponde a una "**Leucemia Linfoblástica**" dado su origen hematopoyético, cuyas células neoplásicas se pueden diseminar a través de la vía hematopoyética y linfoide pudiendo infiltrarse principalmente en órganos hematopoyéticos y linfoides y también en otros órganos, mientras que la presentación tumoral no siempre ocurre. Esto también concuerda con Wittwer y Bóhmwald (1983) quienes definen la Leucemia como una enfermedad neoplásica maligna que afecta a uno o más de los tipos celulares de los tejidos hematopoyéticos y que no siempre cursa con un aumento de la cantidad de células circulantes. Dadas estas características, la nomenclatura utilizada para referirse a este cuadro, tales como "**Leucemia Plasmacitoídea**", "**Anemia Marina**" o "**Leucosis Linfoblástica**" no corresponden, y también se descarta el diagnóstico de "**Leucemia Eritroide**" o "**Eritroblastosis**" descrito por Fredrickson (1990), por lo tanto, de aquí en adelante en este trabajo se hablará de "**Leucemia Linfoblástica**".

Dado lo anterior, la **Leucemia Linfoblástica (Leucemia Linf.)** diagnosticada en estos peces correspondería a una neoplasia principalmente no tumoral de origen hematopoyético, que afecta a órganos hematopoyéticos y no hematopoyéticos y que en muchos casos no cursó con aumento de linfoblastos circulantes (forma aleucémica), por lo tanto, esto explicaría la ausencia de células linfoblásticas circulantes (Linfoblastosis) en la mayoría de los peces con la enfermedad. La Linfocitosis asociada a este problema se debería probablemente a una consecuencia de la condición leucémica o a una estimulación antigénica de los linfocitos T que ocurre en infecciones crónicas (Wittwer y Bóhmwald, 1983).

La Tabla N° 7 registra la prevalencia de **Leucemia Linf.** diagnosticada a través de análisis histológico y calculada en base al total de peces muestreados en forma dirigida para cada especie y región estudiada. De acuerdo a la metodología utilizada para el cálculo de la prevalencia en que solo se analizaron histológicamente aquellos peces seleccionados y no toda la población de peces muestreados por razones de costo, hace que en el proceso de selección se pudieran cometer errores descartando peces que podrían estar positivos a la enfermedad, por lo tanto, los resultados obtenidos deben interpretarse como la mínima prevalencia, y de esta manera se puede decir que el 3.7 % de prevalencia general observada corresponde al mínimo porcentaje de peces con **Leucemia Linf.** en los salmones de cultivo intensivo en fase marina en el Sur de Chile, y la misma interpretación se debe aplicar para las prevalencias observadas para cada especie y región estudiadas.

Las mayores prevalencias se registraron en las especies *O. kisutch* y *O. mykiss* y la menor en *S. salar*, todos ellos muestreados en la X región. Las diferencias de prevalencia observadas en cada especie estarían influenciadas probablemente por diferentes factores, entre ellos el peso de las especies analizadas, diferencias de susceptibilidad interespecies, origen de las ovas de los peces y/o el rol que pudieran tener en este cuadro la presencia de enfermedades como SRS (Síndrome Rickettsial Salmonídeo) y BKD (Enfermedad Bacteriana del Riñón), ya que justamente en los peces que fueron analizados histológicamente se observó la presencia de estas enfermedades principalmente en las especies *O. kisutch* y *O. mykiss* (Tabla N° 9).

Un factor de importancia que se debe considerar en la presentación de **Leucemia Linf.** es la época del año en que se efectuaron los muestreos (primavera - verano), lo cual pudiera condicionar una mayor susceptibilidad a esta enfermedad influenciado principalmente por el alza de las temperaturas de las aguas, lo cual podría también condicionar positiva o negativamente el desarrollo del ciclo de vida del parásito *E. (Nucleospora) salmonis*.

Considerando que la población de peces analizados correspondió a un muestreo dirigido de peces próximos a morir, se podría decir en base a los resultados que al menos el 3.7 % de las mortalidades que se están produciendo en los salmones de cultivo intensivo en fase marina en el Sur de Chile se deben a la presentación de **Leucemia Linf.** en el medio y el mayor impacto estaría siendo provocado en peces de la especie *O. kisutch* y *O. mykiss* de la X región. Asimismo, considerando los peces en los cuales se diagnosticó **L. Linfoblástica** sin estar asociada con otras patologías como SRS y BKD, se puede establecer que al menos un 1,7% de las mortalidades producidas en estos peces se debieron solamente a esta enfermedad.

En los hallazgos observados en peces con **Leucemia Linf.** (Tabla N° 10) están la presencia de anemia originada probablemente por una depresión en la eritrogénesis que ocurre en enfermedades infecciosas crónicas y en neoplasias, o tal vez podría ser una consecuencia de SRS y/o BKD ya que estas enfermedades dañan órganos hematopoyéticos como riñón y bazo alterando la eritrogénesis. Y el aumento de la C. Flogística se debió principalmente a una Leucocitosis probablemente de tipo patológica como una reacción defensiva de los peces frente a SRS, BKD y/o **Leucemia Linf**

Sólo un caso presentó Linfoblastosis lo cual indica que **Leucemia Linf.** se caracterizó por presentarse principalmente en forma aleucémica. Y la presencia de linfoblastos en órganos viscerales en el 93.3 % de los peces con **Leucemia Linf.** es el hallazgo que más concuerda con el diagnóstico histológico, por lo tanto, es el hallazgo que más hace sospechar de una condición leucémica.

Al observar los niveles de asociación entre **Leucemia Linf.**, SRS y BKD (Tabla N° 11) se puede establecer el alto nivel de asociación observado entre **Leucemia Linf.** y SRS, ya que un 46,7 % de los peces positivos a **Leucemia Linf.** presentaron SRS. Una situación similar pero en menor grado se observó con BKD, ya que un 26.7 % de los peces con **Leucemia Linf.** presentaron BKD, y la presencia simultánea de SRS y/o BKD en peces **con Leucemia Linf.** podría ser producto de una invasión bacteriana secundaria concordando con Kent y Dawe (1993) quienes afirman que organismos con cuadros leucémicos u otros desórdenes hemoproliferativos generalmente sucumben a una infección bacteriana secundaria, lo cual sugiere que peces con **Leucemia Linf.** serían más susceptibles a estas patologías. Además, es posible que **Leucemia Linf.** o el agente etiológico de esta enfermedad cause una inmunosupresión en los peces haciéndolos más susceptibles a SRS y BKD, indicando con ello que el impacto producido por esta enfermedad sería aún mayor, producto de la asociación con estos patógenos de gran importancia en la salmonicultura nacional.

Por otra parte, los agentes que provocan inflamaciones crónicas pueden exacerbar la proliferación de células neoplásicas (Potter, 1972; Nevvbound y Kent, 1991 a), por lo tanto, *Renibacterium salmoninarum* agente etiológico de BKD también pudiera actuar como co-factor de **Leucemia Linf.** promoviendo la proliferación de linfoblastos (Kent y col., 1990; Newbound y Kent, 1991 a; Kent y Dawe, 1993) y lo mismo podría acontecer **con Piscirickettsia salmonis** agente etiológico de SRS. Además se descarta a estos agentes como etiología primaria de **Leucemia Linf.**, debido a que muchos peces con esta enfermedad no evidenciaron SRS ni BKD.

Las esporas gram positivas intranucleares observadas en linfoblastos de algunos peces corresponde a la fase madura del parásito microsporídeo intranuclear *Enterocytozoon salmonis* descrito por Chilmonczyk y col. (1991), Wongtavatchai y col. (1995) y Desportes y col. (1996). La presencia de este parásito se observó en 9 casos (2.2 %) del total de peces muestreados principalmente en las especies *O. kisutch* y *O. mykiss* y solo se detectó en el 20.0 % de los casos positivos a **Leucemia Linf.**, por lo tanto, la ausencia del parásito en casos positivos a **Leucemia Linf.** sugiere que éste no sería la causa primaria de la enfermedad, contrariamente a lo planteado por Kent y Dawe (1993), pero sí está asociado en peces con la

enfermedad lo cual sugiere una probable participación del parásito en la patogenia de esta enfermedad.

Por otra parte, la observación de partículas virales que sugiere la presencia de un retrovirus realizada a través de microscopía electrónica de transmisión en algunos peces con **Leucemia Linf.** permite suponer que un agente infeccioso viral, probablemente un retrovirus, podría estar involucrado en la etiología de esta enfermedad concordando con la hipótesis de Kent y col. (1990) y Eaton y Kent (1992), dado que los retrovirus han sido encontrados en varias especies de peces y han sido indicados como agente etiológico de neoplasias en varios casos (Winqvist y col., 1968; Walker, 1969; Papas y col., 1976; Anders y col., 1991; Martineau y col., 1991; Eaton y col., 1993). Asimismo Eaton y Kent (1992), Kent y col. (1993), Eaton y col. (1994) sostienen que un retrovirus denominado *Salmon leukemia virus (SLV)* sería el agente etiológico de esta enfermedad cuya infección resulta en una viremia bimodal y que solo el segundo episodio virémico permanecería hasta que los peces se recuperan o mueren, por lo tanto, esto explicaría la ausencia de partículas virales en algunos casos positivos a **Leucemia Linf.**

Por otra parte, según Dyková y Lom (1980) los parásitos microsporídeos comúnmente son encontrados en peces, pero rara vez están asociados a enfermedades severas, sin embargo están asociados a la presentación de **Leucemia Linf.** concordando con Hedrick y col. (1990), Hedrick y col. (1991), Kent y col. (1991), Kent y Dawe (1993), debido a la infección intranuclear de células hematopoyéticas con características de linfoblastos en peces con la condición leucémica. Por lo tanto, se sugiere la hipótesis que *E. (Nucleospora) salmonis* actuaría induciendo la estimulación de células linfoblásticas a través de la producción de un factor mitogénico soluble descrito por Wongtavatchai y col. (1995) y Desportes y col. (1996), lo que podría explicar la presencia del parásito en peces sin una condición neoplásica aún, y la presencia de Leucemia Linf. sin la presencia de agentes virales.

Por otra parte, no se descarta la hipótesis en que *E. (Nucleospora) salmonis* pueda actuar como co-factor en la presentación de **Leucemia Linf.** promoviendo la replicación de virus oncogénicos (retrovirus) los cuales esencialmente son la causa primaria de todas las neoplasias infecciosas (Kent y Dawe, 1993), tal como ocurre con el parásito microsporídeo *Enterocytozoon bieneusi* en pacientes humanos con SIDA, en donde el parásito está asociado a la infección retroviral (Desportes y col., 1985; Cali y Owen, 1990; Vangool y col., 1995; Dasilva y col., 1996; Desportes y col., 1996; Schwartz y col., 1996), esto podría explicar la presencia simultánea del parásito y de partículas virales en un mismo pez con **Leucemia Linf.**

En el Gráfico N° 3 se presenta la distribución geográfica de los casos positivos a **Leucemia Linf.** Las zonas que registraron la mayor prevalencia, en orden de importancia, fueron: la zona N° 4 que corresponde al área de Chiloé Insular Norte y la zona N° 3 que corresponde al área de Río Negro Hornopirén - Cholgo, seguido por las zonas N° 5 (Chiloé Insular Sur) y N° 2 (F. Reloncaví - Ralún).

Llama la atención que en las zonas N° 2 y 4 la especie más afectada fue *O. kisutch* y en las zonas N° 3 y 5 fue *O. mykiss*, lo cual podría estar influenciado en parte por el

peso de los peces muestreados en cada zona y por la presencia de *E. (Nucleospora) salmonis*, SRS y BKD, ya que los peces de la especie *O. kisutch* muestreados en las zonas N° 2 y 4 tenían un peso promedio mayor a 1.5 Kg. en comparación con el peso promedio de las otras especies en que no sobrepasó los 950 grs. (Anexo N° 3) y al mismo tiempo fue la especie que presentó las mayores asociaciones con el parásito microsporideo, SRS y BKD en estas zonas. Asimismo, en las zonas N° 3 y 5 la especie *O. mykiss* fue la que presentó los mayores niveles de asociación con el parásito microsporideo, SRS y BKD. Y el único caso de **Leucemia Linf.** observado en la especie *S. salar* se presentó en la zona N° 4, lo que permite suponer que si no existiera influencia del peso en la presentación de la enfermedad, esta sería probablemente la especie menos susceptible puesto que el mayor número de peces analizados histológicamente correspondió a esta especie.

La distribución geográfica de los casos de **Leucemia Linf.** en las zonas indicadas no significa que la enfermedad se encuentre distribuida solamente en estas áreas, debido a que su presentación en los peces pudiera estar influenciado por el procedimiento y técnica de diagnóstico, la época del año en que se efectuó el muestreo, el peso y número de peces muestreados en cada zona, la presencia o no de otras enfermedades asociadas al problema y por último la dinámica en la diseminación de la enfermedad, ya que según Newbound y Kent (1991 b) y Baxa-Antonio y col. (1992) esta enfermedad se podría transmitir horizontalmente entre peces de la misma especie y también entre peces de especies diferentes (Newbound y Kent, 1991 a) e incluso se sugiere que podría transmitirse verticalmente (Kent y col., 1993).

Bajo las condiciones del presente estudio se concluye que:

- Existe una enfermedad diagnosticada como "**Leucosis Linfoblástica**" en salmonídeos de cultivo intensivo en fase marina en el Sur de Chile.
- La enfermedad diagnosticada como "**Leucosis Linfoblástica**" corresponde clínica e histológicamente a una enfermedad diagnosticada en Canadá y Estados Unidos como "**Leucemia Plasmacitoídea**" o "**Anemia Marina**".
- La enfermedad diagnosticada como "**Leucosis Linfoblástica**", histológicamente corresponde a una "**Leucemia Linfoblástica**".
- Clínicamente **Leucemia Linfoblástica** se caracterizó por presentar las siguientes alteraciones: natación superficial y letárgica, oscurecimiento de la piel, palidez branquial, abultamiento abdominal, esplenomegalia, renomegalia, acumulación de líquido en el estómago y ocasionalmente presencia de exoftalmia bilateral.
- Al estudio sanguíneo **Leucemia Linfoblástica** se caracterizó principalmente por la presentación de anemia, aumento del nivel de la Capa Flogística y Leucocitosis.
- Histológicamente **Leucemia Linfoblástica** se caracterizó por la presencia de infiltrado de células linfoblásticas inmaduras en órganos hematopoyéticos y no hematopoyéticos.

- Las células linfoblásticas encontradas en peces con **Leucemia Linfoblástica** se caracterizan histológicamente por presentar pleomorfismo, escaso citoplasma, diferentes tamaños, nucléolos prominentes y algunas de ellas presentan cuerpos de inclusión intranucleares y alto porcentaje de figuras mitóticas. A la tinción de Giemsa se caracterizan por presentar bordes lisos, escaso citoplasma basofílico, un gran núcleo y una zona citoplasmática que se tiñe débilmente denominada "yuxtannuclear hof".
- Dada las características de inmadurez de las células linfoblásticas, la **Leucemia Linfoblástica** corresponde a una neoplasia.
- La prevalencia general de **Leucemia Linfoblástica** en salmonídeos de cultivo intensivo en fase marina en el Sur de Chile, muestreados en forma dirigida, fue de 3.7 % siendo de 4.7 % en la X región y 0 % en la XI región. Por especie, las mayores prevalencias se observaron en *O. kisutch* y *O. mykiss* y la menor en *S. salar*.
- Las prevalencias de **Leucemia Linfoblástica** determinadas a través de muestreos dirigidos y diagnosticadas a través de histología, corresponden al mínimo porcentaje de peces afectados por esta enfermedad.
- El total de peces que presentaron **Leucemia Linfoblástica** sin asociación con SRS y/o BKD fue de 1.7%, lo cual corresponde a las mínimas pérdidas directas ocasionadas por esta enfermedad.
- **Leucemia Linfoblástica** se observó asociada a SRS (Síndrome Rickettsial Salmonídeo) y a BKD (Enfermedad Bacteriana del Riñón) en un 46.7% y 26.7%, respectivamente.
- Los casos positivos de Leucemia Linfoblástica se distribuyeron geográficamente solo en la X región, específicamente en las zonas de Chiloé Insular, Río Negro Hornopirén - Cholgo y F. Reloncaví - Ralún.
- Se observó la presencia de un parásito microsporídeo intranuclear denominado *Enterocytozoon (Nucleospora) salmonis* en células linfoblásticas de salmones con **Leucemia Linfoblástica**.
- Se observó la presencia de partículas virales que sugiere la presencia de retrovirus en salmones con **Leucemia Linfoblástica**.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ACHURRA, M.** 1992. Gran impulso a la salmonicultura chilena. Chile Pesquero. Agosto-Septiembre: 21 - 25.
- AMOS, K.H.** 1985. Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. Fish Health Blue Book. Am. Fish Soc. Fish Health Sec. Corvallis, Oregon. pp. 114.
- ANDERS, K., I. HILGER y H. MOLLER.** 1991. Lentivirus - like particles in connective tissue tumours of fish from Germán coastal waters. Dis. Aquat. Org. 11:151-154.
- BAXA - ANTONIO, D., J.M. GROFF y R.P. HEDRICK.** 1992 Experimental Horizontal Transmission of *Enterocytozoon salmonis* to chinook salmón, *Oncorhynchus tshawytscha*. J. Euk. Microbiol. 3:699-702.
- BOWSER, P.R.** 1993. Retroviruses of fish. Annual Rev. of Fish Diseases. pp. 209 - 224.
- BRAVO, S.** 1992. El dilema de las ovas de salmónes. Chile Pesquero. Diciembre - Enero: 55-59.
- BRAVO, S.** 1993. Screening para ovas importadas. Chile Pesquero. Julio - Agosto: 35 - 37.
- BUSTOS, P.** 1991. Aquaveterinaria. Aquanoticias Internacional. Diciembre: 29.
- BUSTOS, P.** 1993. Pérdidas por enfermedades bacterianas de salmónidos en Chile. Aquanoticias Internacional. Octubre - Diciembre: 4-13.
- CALI, A. y OVV'EN, R.L.** 1990. Intracellular development of *Enterocytozoon*, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. J. Protozool. 37:145 - 155.
- CASSIGOLI, J.** 1995. Evaluación del riesgo potencial de introducir patógenos de salmónidos a Chile por importación de ovas. En: Seminario-Taller: Riesgos del potencial ingreso y propagación de patógenos de salmónidos en Chile. APST-INTESAL, Puerto Montt, Chile, pp. 1 -5.
- CHILMONCZYK, S., VV.T. COX y R.P. HEDRICK.** 1991 *Enterocytozoon salmonis* N sp.: an intranuclear microsporidium from salmonid fish. J. Protozool. 38:264 - 269.
- DASILV A, A.J., D.A. SCHVV ARTZ, G.S. VIVESVARA, H. DEMOURA, S.B. SLEMENDA y N.J. PIENIAZEK.** 1996. Sensitivo PCR diagnosis of infections by *Enterocytozoon bienewisi* (Microsporidia) using primers based on the región coding for small- subunit ribosomal-RNA. J. of Clinical Microbiology. 34: 986 - 987.

- DESPORTES, I., Y. LE CHARPENTIER, A. CALÍAN, F. BERNARD, D. COCHAND - PRIOLLET, A. LAVARNE, P. RAVISSE y R. MODIGLIANI.** 1985 Ocurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp. in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozool. 32: 250 - 253.
- DESPORTES, I., S.CHILMONCZYK, R. HEDRICK, C. OMBROUCK, D. MONGE, I. MAIGA y M. GENTILINI.** 1996. Comparative development of two microsporidian species: *Enterocytozoon bieneusi* and *Enterocytozoon salmonis*, reported in AIDS patients and salmonid fish, respectively. J. Euk. Microbiol. 43:49-60.
- DYKOVÁ, I. y J. LOM.** 1980. Tissue reactions to microsporidian infections in fish. J. Fish Dis. 3:265-283.
- EATON, W.D. y M.L. KENT.** 1992. A retrovirus in chinook salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) with plasmacytoid leukemia and evidence for the etiology of the disease. Cáncer Research. 52: 6496 - 6500.
- EATON, W.D., B. FOLKINS, J. BAGSHAW, G. TRAXLER y M.L. KENT.** 1993 Isolation of a retrovirus from two fish cell lines developed from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) with plasmacytoid leukaemia. J. of General Virology. 74: 2299-2302.
- EATON, W.D., B. FOLKINS, y M.L. KENT.** 1994. Biochemical and histologic evidence of plasmacytoid leukemia and salmón leukemia virus (SLV) in wild - caught chinook salmón *Oncorhynchus tshawytscha* from British Columbia expressing plasmacytoid leukemia. Dis. Aquat. Org. 19:147-151.
- EVERMANN, J. F.** 1990. Comparative features ofretroviral infections oflivestock. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 13: 127- 136.
- FREDRICKSON, T.N., A.H. VVALSH y R.E. WOLKE.** 1990. Tumors of the lymphoid and other hemopoietic tissues, in: Pathobiology of spontaneous and induced neoplasms in fishes: morphology, Comparative characterization and literature. Academic Press, New York. pp. 293-311.
- GIBBS, E.P.J.** 1987. Enfermedades víricas de los animales de abasto. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, pp. 507.
- HEDRICK, R.P., J.M. GROFF, T.S. Mc DOWELL, M. WILLIS y VV.T. COX.** 1990. Hematopoietic intranuclear microsporidian infections with features of leukemia in chinook salmón *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 8:189 - 197.

- HEDRICK, R.P., J.M. GROFF, y D.V. BAXA.** 1991 Experimental infections with *Enterococytozoon salmonis* Chilmonczyk, Cox, Hedrick (Microsporea): an intranuclear microsporidium from chinook salmón *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 10:103- 108.
- HORZINEK, M.C.** 1980. Compendio de virología general. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, pp. 174.
- JARRET, W.F.H. y L.J. MACKEY.** 1974. Neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues. En: International histological classification of tumours of domestic animáis. Bull. Wld. Hlth. Org. 50:21 -34.
- KENT, M.L., J.M. GROFF, G.S. TRAXLER, J.G. ZINKL y J.VV. BAGSHAW.** 1990 Plasmacytoid leukemia in seawater reared chinook salmón *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 8:199-209.
- KENT, M.L., J.VV. BAGSHAW. G.C. NEW BOUND, G.S. TRAXLER, S.C. DAWE, J.R. ROOME, VV.E. EATON, J.M. GROFF y D. SPEARE.** 1991 Plasmacytoid leukemia (Marine Anemia): Viral or Microsporidian etiology?. Fish Health Section - American Fisheries Society Newsletter. 19 : 1-2.
- KENT, M.L. y DAWE.** 1993. Further evidence for a viral etiology in plasmacytoid leukemia of chinook salmón *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 15: 115 - 121.
- KENT, M.L., G.C. NEWBOI ND, S.C. DAWE, C. STEPHEN, W.D. EATON, G.S. TRAXLER, D. KIESER y R.F. MARKHAM.** 1993. Observations on the transmission and range of plasmacytoid leukemia of chinook salmón. Fish Health Section - American Fisheries Societv Newsletter. 21 : 1-3.
- LANNAN, C., A. EWING y J. FRYER.** 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in chilean salmonids. J. Aquat. Animal Health. 3: 229 - 234.
- MACCHIAVELLO, M.** 1992. Control de enfermedades virales en salmones. Chile Pesquero. Junio - Julio: 39 - 42.
- MARDONES, A. y R. VEGA.** 1993. Ovas, alevines y smolts: las necesidades de Chile. Aquanoticias Internacional. Julio - Septiembre: 6-15.
- MARDONES, A., R. VEGA y J. ZAMORANO.** 1995. Estudio del mercado de ovas, alevines y smolts de salmonídeos en Chile 1995. En: Seminario - Taller: Riesgos del potencial ingreso y propagación de patógenos de salmónidos en Chile. APST - INTESAL, Puerto Montt, Chile, pp. 43.

- MARTINEAU, D., R. RENSHAW, J.R. WILLIAMS, J.W. CASEY y P.R. BOWSER.** 1991. A large unintegrated retrovirus DNA species present in a dermal tumor of valleye *Stizostedion vilreum*. Dis. Aquat. Org. 10: 153 - 158.
- MENDEZ, R. y C. MUNITA.** 1989. La salmonicultura en Chile. Ed. Ricardo Cortés, Santiago, pp. 299.
- MENDEZ, R. y L. VIDAL.** 1994. La salmonicultura chilena en 1993. Aquanoticias Internacional. Enero - Marzo: 24-39.
- MIDTLYNG, P., S. HELGASON, E. JANSSON, A. MORTENSEN y E. RIMALA-PÄRNÄNEN.** 1992. Nordic manual for the surveillance and diagnosis of diseases in farmed salmonids. Nordiske Seminar - og Arbejdsrapporter, Copenhagen. pp. 65.
- MORRISON, J.K., E. MAC CONNELL, P.F. CHAPMAN y R.L. WESTGARD.** 1990. A microsporidium - induced lymphoblastosis in chinook salmón *Oncorhynchus tshawytscha* in freshwater. Dis. Aquat. Org. 8:99-104.
- NEWBOUND, G.C. y M.L. KENT.** 1991a. Experimental interspecies transmission of plasmacytoid leukemia in salmonid fishes. Dis. Aquat. Org. 10:159-166.
- NEWBOUND, G.C. y M.L. KENT.** 1991b. Prevalence of plasmacytoid leukemia in British Columbia chinook salmon. Fish Health Section - American Fisheries Society Newsletter. 19:1 - 2.
- NEWBOUND, G.C., R.J. MARKHAM, D.J. SPEARE, S.M. SAKSIDA, B.M. DESPRÉS, B.S. HORNEY, F.S. KIBENGE, J.A. SHEPPARD, G.M. VVRIGHT y M.L. KENT.** 1993. Production of monoclonal antibodies specific for antigens derived from tissue of chinook salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) affected with plasmacytoid leukemia. American Journal of Veterinary Research. 54:1426-1431.
- NEWBOUND, G.C., R.J. MARKHAM, M.L. KENT, D.J. SPEARE y M.A. THORBLRN.** 1995. Comparative analysis of a monoclonal antibody - based immunofluorescence test for plasmacytoid leukemia in chinook salmón *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 21: 123- 130.
- PAPAS, T.S., J.E. DAHLBERG y R.A. SONSTEGARD.** 1976. Type C virus in lymphosarcoma in northern pike (*Esox lucius*). Nature. 261: 506 - 508.
- POTTER, M.** 1972. Immunoglobulin - producing tumors and myeloma proteins of mice. Phys. Rev. 52:631 -719.
- RIEDEMANN, S.** 1992. Una visión actualizada de leucosis bovina desde el punto de vista virológico. Patología Animal. 6 : 22 - 27.

- ROCKEY, D., L. GILKEY, G. WIENS y S. KAATTARI.** 1991. Monoclonal antibody - based analysis of the *Renibacterium salmoninarum* p 57 protein in spawning chinook and coho salmon. Journal of Aquatic Animal Health. 3: 23 - 30.
- SCHALM, O.W., Y. N.C. JAIN y E. CARROL.** 1975. Veterinary hematology. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 807.
- SCHWARTZ, D.A., I. SOBOTIKA, G.J. LEITCH, A. CALI y G.S. VIVESVARA.** 1996 Pathology of microsporidiosis - emerging parasitic infections in patients with acquired -immunodeficiency - syndrome. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 120: 173- 188.
- STEPHEN, R.C., C.S., RIBBLE y M.L. KENT.** 1995. Observer variation in the histological diagnosis of plasmacytoid leukemia (Marine Anemia). Can. J. Vet. Res. 59:15-19.
- STOSKOPF, M.K.** 1993. Fish Medicine. Ed. W.B. Saunders Company , Philadelphia. pp. 882.
- TRUST, T.J.** 1986. Pathogenesis of infections diseases of fish. Ann. Rev. Microbiol. 40: 479- 502.
- VANGOOL, T., E. LIIDERHOFF, K.J. NATHOO, C.F. KIRE, J. DANKERT y P.R. MASON.** 1995. High prevalence of *Enterocytozoon - bieneusi* infections among HIV -positive individuals with persistent diarrhea in Harare, Zimbabwe. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 89 : 478 - 480.
- WALKER, R.** 1969. Virus associated with epidermal hyperplasia in fish. Natl. Cancer Inst. Monogr. 33: 195-207.
- WINQVIST, G., O. LUNDBERG y B. HELLSTROEM.** 1968 Skin tumors of northern pike (*Esox lucius*) II. Viral particles in epidermal proliferations. Bull. Off. Int. Epiz. 69: 1023-1031.
- WITTWER, F. y H. BÖHMVALD.** 1983. Manual de patología clínica veterinaria. Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. Chile, pp. 167.
- WONGTAVATCHAI, J. y R. HEDRICK.** 1993. In vitro cultivation of the microsporidium *Enterocytozoon salmonis*. Fish Health Section - American Fisheries Society Newsletter. 21:4.
- WONGTAVATCHAI, J., P. A. CONRAD y R.P. HEDRICK.** 1995 In vitro characteristic of the microsporidian: *Enterocytozoon salmonis*. J. Euk. Microbiol. 42 : 401 -405.

**ANEXO N° 1**

EMPRESA : \_\_\_\_\_  
 CENTRO : \_\_\_\_\_  
 ESPECIE : \_\_\_\_\_  
 JAULA : \_\_\_\_\_

**PROTOCOLO DE EXAMEN CLINICO EXTERNO**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Longitud (cm)												
Peso (g)												
<b>EXAMEN EXTERNO</b>												
Estado nutricional (B-R-M)												
Condición/Comportamiento												
Piel: - Induraciones												
- Ulceras abiertas												
- Hemorragias												
- Coloración oscura												
- Abscesos												
- Otro												
Aletas: - Deshilachadas												
- Deformadas												
- Hemorrágicas												
- Sin aleta caudal												
- Otro												
Ojos: - Exoftalmia (1-2)												
- Opacidad (1-2)												
- Hemorragia (1-2)												
- H. retrobulbar (1-2)												
- Ciegos												
- Otro												
Branquias: - Pálidas												
- Con mucosidad												
- Otro												

OBSERVACIONES: .....

.....

.....

.....

## ANEXO N° 2

## PROTOCOLO DE EXAMEN CLINICO INTERNO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>EXAMEN INTERNO</b>												
Cavidad corporal:												
- Ascitis												
- Grasa vis. hemorr.												
- Otro												
Migados: - Pálido												
- Areas blanquecinas												
- Aumento volumen												
- Abscesos												
- Congestivo												
- Petequias												
- Otro												
Ves. biliar:												
- Repleción												
- Alteración del color												
- Otro												
Bazo:												
- Aumento volumen												
- Congestivo												
- Abscesos												
- Ausente												
- Otro												
Hígado:												
- Aumento volumen												
- Congestivo												
- Abscesos												
- Otro												
Estómago:												
- Con alimento												
- Sin alimento												
- Hemorrágico												
- Con líquido												
- Otro												
Intestinos:												
- Sin alimento												
- Hemorrágico												
- Pared engrosada												
- Otro												
O. Reproduc.:												
- Vestigios												
- Prematuros												
- Hemorrágicos												
- Otro												
Musculaturas:												
- Hemorrágica												
- Otro												
Vejiga Beseosa:												
- Hemorrágica												
- Otro												

OBSERVACIONES: .....

## ANEXO N° 3

Promedios de peso y longitud, de los peces muestreados según especie, zona y región muestreadas.

Zona y Región Muestreada	<i>O. kisutch</i>				<i>O. mykiss</i>				<i>S. salar</i>				Total			
	n	%	Peso Prom. (Kg)	Long. Prom. (cm)	n	%	Peso Prom. (Kg)	Long. Prom. (cm)	n	%	Peso Prom. (Kg)	Long. Prom. (cm)	n	%	Peso Prom. (Kg)	Long. Prom. (cm)
Zona 1	12	3.0	0.81	44.6	24	6.0	0.92	29.8	47	11.7	0.60	33.9	83	20.6	0.72	34.3
Zona 2	12	3.0	2.13	49.7	11	2.7	0.06	15.8	25	6.2	0.63	17.6	48	11.9	0.87	25.2
Zona 3	15	3.7	2.73	49.9	18	4.5	2.40	47.7	23	5.7	1.56	51.3	56	13.9	2.14	49.8
Zona 4	36	8.9	1.53	46.8	20	5.0	0.95	36.6	26	6.5	0.39	33.8	82	20.3	1.03	40.2
Zona 5	5	1.2	1.48	49.6	20	5.0	0.95	35.2	23	5.7	0.60	37.6	48	11.9	0.84	37.9
<b>X REGIÓN</b>	80	19.9	1.73	47.7	93	23.1	1.16	34.2	144	35.7	0.91	43.5	317	78.7	1.10	37.7
Zona 6	12	3.0	0.15	24.7	12	3.0	0.15	21.3	13	3.2	0.34	15.7	37	9.2	0.22	20.4
Zona 7	10	2.5	3.46	57.3	11	2.7	0.62	26.4	28	6.9	0.19	25.4	49	12.2	0.95	32.1
<b>XI REGIÓN</b>	22	5.5	1.70	39.5	23	5.7	0.37	23.7	41	10.2	0.24	22.3	86	21.3	0.64	27.1
<b>TOTAL</b>	102	25.3	1.72	45.9	116	28.8	1.00	32.1	185	45.9	0.61	31.7	403	100	1.00	35.4

## ANEXO N° 4

### IFAT-SRS (LannanvcoL 1991)

- Desgrasar los portaobjetos en acetona durante 10 minutos y secar al aire.
- Extender la muestra renal sobre el portaobjetos.
- Secar al aire las muestras y fijarlas en acetona por 5 minutos (este paso ayuda a disminuir la fluorescencia no específica debido a que remueven los lípidos en la muestra).
- Depositar una o dos gotas de la dilución de trabajo ( $10^{-3}$  en PBS) del anticuerpo anti- **P. salmonis** de conejo e incubar en una cámara húmeda por 60 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las muestras con PBS (pH 7,0) y luego sumergirlos en el mismo PBS por 5 minutos.
- Aplicar una o dos gotas de la dilución de trabajo del segundo anticuerpo anti- anti **P. salmonis**- FITC (Sigma) e incubar en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las muestras por 10 minutos en agitación con PBS (pH 7,0).
- Mantener por 15 segundos las muestras en la tinción de contraste azul de Evan's (0,1% en PBS).
- Lavar con PBS (pH 7,0) y luego sumergirlos en el mismo PBS por 5 minutos.
- Agregar una gota de fluido de montaje (pH 8,6) y tapar con cubreobjeto.
- Ver la muestra usando aceite de inmersión en un microscopio de fluorescencia.
- La lectura se interpreta de acuerdo a la adaptación del Servicio de Ictiopatología de Fundación Chile, que tomó como referencia el esquema de Hará (1989) para BKD.

### SOLUCIONES

-0 01 M PBS (pH 7,0)

Solución A: 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O-29 g/l)

Solución B: 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O-53,7 g/l)

Combinar 16,5 ml de solución A, 33,5 ml de solución B, 7.4g NaCl y completar 1 l con agua destilada.

## ANEXO N° 5

### ELISA MONOCLONAL (K-Dtect ®)

- Preparación de la muestra.
- Dilución 1:1 (riñón-buffer) (peso-volumen)
- Macerar y centrifugar (3000 r.p.m. por 10 minutos)
- Tomar sobrenadante y colocarlo en tubo Ependorf
- Lavar la placa con PBS / tween 20 una vez y secar
- Colocar 50 ul de buffer de dilución (blanco: pocilio A1 y A2)
- Colocar 50 ul de standares controles (alto en pocilios A3 y A4, medio en pocilios A5 y A6, bajo en pocilios A7 y A8)
- Colocar 50 ul de cada una de las muestras en el resto de los pocilios, en duplicado.
- Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
- Lavar la placa 3 veces
- Colocar 50 ul del anticuerpo monoclonal en cada pocilio (Frasco D)
- Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
- Lavar la placa 3 veces
- Colocar 50 ul de Streptavidin-HRP en cada pocilio (frasco E)
- incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Lavar la placa 3 veces
- Preparar la solución de peróxido de hidrógeno y ABTS (frasco F) (44 ul de peróxido de hidrógeno por 11 ml de ABTS)
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, con agitación suave.
- Colocar 50 ul de solución stop (frasco G)
- Leer

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas aquellas personas que permitieron la realización de este estudio, especialmente al Dr. Ricardo Enríquez Sais, profesor patrocinante, por su gran amistad, paciencia y apoyo en la conducción de esta tesis.

- Al Dr. Carlos Parías por su incondicional amistad y participación activa en salidas a terreno.

- A la Sra. Mónica Monrás (T.M.) y Sra. Mónica González por su permanente amistad, ayuda y consejos.

- Al Sr. Esteban Henríquez por su gran solidaridad y apoyo durante la ejecución de esta investigación y porque fue un gran amigo.

- A todos mis compañeros y amigos tesistas, quienes me apoyaron constantemente y me entregaron su valiosa colaboración.

- A todas las empresas salmoneras que participaron en este estudio.

- A la Sra. Patricia Salas por la facilitación de su laboratorio de diagnóstico ubicado en Castro.

- A mi familia y a Elizabeth Fuentes por su continuo apoyo, cariño y comprensión.

- Finalmente quiero agradecer en forma muy especial a INTESAL S.A. y al Proyecto FONDECYT N° 1960501 por el financiamiento parcial para la realización de este estudio.