



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

Determinación de la virulencia de dos cepas del virus
IPN en *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Grado de
LICENCIADO EN MEDICINA VETERI-
NARIA

Yasna Marisol Calderón Gübelin
Valdivia Chile 1998

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enriquez

PROFESOR COPATROCINANTE

Enrique Dauder

COLABORADOR

Mónica Leonés

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Julio Thibaut

Dr. Jorge Ulloa

FECHA DE APROBACION

A RODRIGO

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	SUMMARY.....	2
3.	INTRODUCCION.....	3
4.	MATERIAL Y METODO.....	9
5.	RESULTADOS.....	15
6.	DISCUSION.....	27
7.	BIBLIOGRAFIA.....	32
8.	AGRADECIMIENTOS.....	37

1. RESUMEN

La Necrosis Pancreática Infecciosa es una enfermedad viral altamente contagiosa que causa mortalidad de alevines que se encuentran en la primera etapa de alimentación. El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es isométrico, no envuelto, con un genoma de doble cadena RNA, y pertenece a la familia Birnaviridae. Se han reportado aislamientos en Norte América (Canadá y EE.UU.), América del Sur (Chile), Europa y Asia (Japón, Korea, Taiwan y Tailandia).

Con el fin de reproducir la enfermedad y estudiar la virulencia de las cepas Ab y VR-299, se infectaron vía baño, alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) de 17 +/- 1,5 grs. y salmón atlántico (*Salmo salar*) de 5 +/- 1 gr. Los títulos virales utilizados para la infección de salmón coho fueron $10^{8,16}$ TCID₅₀/ml de VR-299 y $10^{8,33}$ TCID₅₀/ml de Ab; y para la infección de salmón atlántico fue $10^{7,16}$ TCID₅₀/ml de VR-299 y $10^{6,63}$ TCID₅₀/ml de Ab.

Se midió la mortalidad diaria y acumulada que ambas cepas produjeron en las dos especies. En salmón coho la cepa VR-299 produjo una mortalidad del 34%, mientras que la cepa Ab no produjo mortalidad. En salmón atlántico la cepa VR-299 produjo un 40% de mortalidad y la cepa Ab un 8%. La sinología clínica que presentaron estos peces fue leve e inespecífica. Para el estudio de patogenia se tomaron muestras diariamente de todos los peces muertos / moribundos y se les realizó un examen virológico, cuyos resultados fueron confirmados con IFAT-IPNV; en los peces salmón coho se encontraron 3 muestras positivas (CPE) del grupo infectado con la cepa Ab y 8 muestras positivas (CPE) del grupo infectado con la cepa VR-299, en los salmones atlántico se encontraron 6 muestras positivas en el grupo infectado con la cepa Ab y 6 muestras positivas del grupo infectado con la cepa VR-299.

En el estudio del estado portador observamos que en los peces salmón coho infectado, la cepa Ab se mantuvo el día 10 post-infección, y la cepa VR-299 se mantuvo hasta el día 20; en el salmón atlántico la cepa Ab se mantuvo hasta el día 20 y la cepa VR-299 hasta el día 25 post-infección. Histopatológicamente se confirmó una necrosis producida por el virus IPN, específicamente en páncreas, hígado y riñones.

Nuestros resultados nos llevan a concluir que la cepa VR-299 del virus IPN presente en Chile es notoriamente más virulenta que la cepa Ab, en ambas especies de salmonídeos de cultivo.

2. SUMMARY

The infectious pancreatic necrosis (IPN) is a highly contagious viral diseases that cause mortality in fingerlings in the first feeding stage. The IPNV virus is a non enveloped, isometric, double stranded RNA virus belonging to the family Birnaviridae. The virus has been reported in North (Canada and U.S.A.) and South America (Chile), Europe and Asia (Japan, Korea, Taiwan and Thailand).

The aim of this study was to develop the disease experimentally and to determine the virulence of the strains Ab and VR-299 of IPNV, trough the artificial infection of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and Antlantic salmon (*Salmo salar*) fingerling. The viral titles of VR-299 used for coho and salmon fingerlings were $10^{8,16}$ TCID₅₀/ml, $10^{7,16}$ TCID₅₀/ml, respectively whereas for Ab strain they were $10^{8,33}$ TCID₅₀/ml and $10^{6,33}$ TCID₅₀/ml.

Daily and cumulative mortality produced by both strains was recorded. VR-299 produced a 34% and a 40% of mortality in coho and Atlantic salmon, repectively. Ab strain was unable to induce mortality in coho salmon but in Atlantic salmon the observed mortality was 8%. The clinical signs were mild and unspecific.

In order to establish the pthogenicity of this viral pathogen, samples of dead or moribund fish were obtained daily and a virological test was carried out those positive samples were confirmed by IFAT-IPNV. Among the infected coho fingerling three samples were positive to strain Ab and 8 samples to strain VR-299. Six positive samples were found in both, groups of Atlantic salmon challenged with strain Ab and VR-299 respectively.

In relation to the carrier state, in coho fingerling Ab and VR-299 strains remained after 10 and 20 days post-infection, respectively. In Atlantic fingerling, Ab and VR-299 strains remained for 20 and 25 days post-infection, respectively. Kidney, liver and pancreas necrosis produced by IPNV was confirmed by histopathology.

Based on these results, we conclude that the strain VR-299 of the IPNV present in Chile is notoriously more virulent than Ab strain for both salmonids species, under culture conditions.

3. INTRODUCCION

El cultivo confinado del salmón tiene a Noruega como su principal productor en la actualidad, que lo sustenta sobre la base de la producción de salmón del atlántico (*Salmo salar*). El cultivo del salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) es más reciente y dentro de sus principales cultores se encuentra Chile junto a Japón y Canadá (Méndez y Munita, 1989).

Los principales mercados chilenas son EE.UU. y Japón. Producto del alto crecimiento de la producción chilena en años recientes, y con un ritmo de crecimiento superior al 20% anual, ha incursionado además hacia el mercado Europeo (Peres, 1996). Las exportaciones en 1996 llegaron a 538 millones de dólares, gracias al envío de más de 135 mil toneladas netas (Aviles, 1997).

Junto a los excelentes resultados obtenidos en el cultivo de salmones y truchas, se han presentado diversos problemas. Entre ellos, destaca la presencia de nuevas enfermedades, tanto de origen bacteriano como viral. Estas últimas son consideradas de mayor seriedad, debido a la dificultad del diagnóstico, ya que la mayoría de las epizootias son agudas o subagudas y, además, a la inexistencia de un tratamiento quimioterapéutico para ellas (Sano, 1995).

El impacto económico de las virosis se hace sentir principalmente en las condiciones de explotación intensiva. Las pérdidas afectan generalmente a animales jóvenes, y su costo directo es más sensible cuando se producen más tarde, puesto que la inversión que supone el cuidado y el alimento aumenta con el tiempo. En países europeos, la pérdida económica causada por la Septicemia Viral Hemorrágica en truchiculturas, representa más de cuarenta millones de libras esterlinas cada año (Hill, 1992). Muchos piscicultores consideran a la Necrosis Pancreática Infecciosa, poco grave, ya que no afecta clínicamente más que a los alevines de algunos *Salmonidae*. Esta actitud deberá cambiar pronto pues la elevación de los gastos de producción (alimento y mano de obra) hará que cualquier causa de pérdidas en otro tiempo considerada poco importante, se vuelva intolerable (De Kinkelin y col., 1991).

El primer aislamiento, en Chile, del virus IPN fue de una piscicultura de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), y constituye el primer reporte del virus en Sud

América. Las evidencias sugieren que el virus IPN fue introducido con ovas importadas desde Norte América (Mac Allister y Reyes, 1984).

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) pertenece a la familia Birnaviridae. Los birnavirus son virus isométricos no envueltos con un genoma de doble cadena RNA. Este nombre fue propuesto por Dobos y col. (1979) para un grupo emergente de virus de huéspedes sin parentesco y la familia comprende IPNV de la Infección Pancreática Infecciosa de peces y mariscos, el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (IBDV) de los pollos, y el virus Drosophila X (DXV) de *D. melanogaster*. La familia es ahora aceptada como un grupo válido por las autoridades en clasificación de virus (Mims y White, 1984; Roberts, 1989). Pero no fue hasta 1984 que la familia fue oficialmente designada *Birnaviridae* (Fenner y col., 1993).

Actualmente, se pueden reunir los virus IPN en tres grupos serológicos, según su comportamiento frente a la seroneutralización (Okamoto y col, 1983):

- El grupo I, americano, mejor representado por el virus West Buxton que por VR 299 considerado hasta ahora como el modelo del grupo;

- El grupo II, europeo, conocido con el nombre de Sp (Vestergard- Jorgensen y Kehlet, 1971);

- El grupo III, que corresponde al virus de tipo Ab considerado como Danés, y el virus de la Branquionefritis de la anguila conocido también con el nombre de EVE (Sano y col., 1981; de Kinkeliny col., 1991).

Otros serotipos han sido descritos en la literatura: IPNV-He e IPNV- Te (Ahne y col., 1987; Quaglio, 1989).

IPNV es sensible a la temperatura pero puede ser preservado por congelación a -80°C , sin embargo puede haber diferencias de serotipos a la sobrevivencia en congelamiento. IPNV puede ser almacenado por varios años en glicerol al 10% a 4°C , pero para almacenamientos más largos se recomienda preservarlo en suero fetal al 10% o glicerol al 50% a -80°C . El virus es levemente resistente a pH ácido (2-5) pero lábil a pH alcalino (Vestergard-Jorgensen, 1974), y esto sin duda explica su resistencia a enzimas proteolíticas ácido activas intestinales y su exitoso pasaje a través del intestino. IPNV es poco resistente a los rayos ultravioletas en comparación con Rhabdovirus. Yoshimizu y col. (1986) establecen que el IPNV requiere de una dosis de $1.0 - 1.5 \times 10^5 \text{ uW s/cm}^2$ de rayos ultravioletas para inactivar el 99% de infecciosidad, dosis 100 veces superior requiere el virus de la Necrosis Hematopoyética. Infecciosa. IPNV es gradualmente inactivado en agua natural o agua

destilada y es no menos estable en estuarios o agua marina, reflejando un potencial del virus para permanecer infeccioso en todo medio ambiente acuático (Roberts, 1989). A la desecación en superficie de laboratorio sobrevive durante 5 semanas a 20°C. La pérdida de infecciosidad después de calentarlo 30 minutos a 60°C es sólo del 80% (Dorson, 1982). El virus IPN no es inactivado por exposición al éter, cloroformo, o glicerol, pero es rápidamente inactivado cuando es expuesto al cloro, yodo, ozono, o radiación ultravioleta. Cuando aumenta la dureza del agua, se necesitan progresivamente mayores concentraciones y tiempo de contacto más largos para inactivar el virus con cloro y ozono (Wedemeyer y col., 1978). La actividad viricida del cloro y yodo son reducidos por la materia orgánica y niveles de pH de alrededor de 8 (Amend y Pietsch, 1972; Elliot y Amend, 1978; Stoskopf, 1993).

El IPNV ha sido frecuentemente aislado de peces de agua dulce y salada, sin embargo se ha encontrado patógeno sólo para un limitado número de especies salmonídeas: *Salvelinus fontinalis* (Wolf y col., 1960), *Oncorhynchus mykiss* (Parisot y col., 1963), *Salvelinus alpinus* (Ljungberg y Jorgensen, 1972), *Oncorhynchus rhodurus*, *Oncorhynchus nerka* (Sano, 1973), y *Salmo trutta* (Mac Knight y Roberts, 1976). Además de estas especies, la enfermedad ha sido experimentalmente inducida en *Salmo clarki* (Parisot y col., 1963) y en *Esox lucius* (Dorson y col., 1987; Quaglio, 1989; Yamamoto y Shankar, 1992).

La Necrosis Pancreática Infecciosa es una enfermedad aguda altamente contagiosa que causa mortalidad de alevines y peces pequeños, ocasionalmente en peces de un año. Generalmente resultan afectados primero los alevines y juveniles más grandes y de aspecto más saludable (Hill, 1982).

Un signo importante es el aumento de la resistencia del hospedador con la edad, los peces más susceptibles son aquellos que se encuentran en la etapa de primera alimentación y la mayor resistencia es alrededor de los cinco a seis meses. Otro elemento importante es la temperatura del agua. La frecuencia de la enfermedad, en efecto, disminuye notablemente a temperaturas menores de 5,5°C y mayores de 16°C (Quaglio, 1989).

Los signos clínicos de la enfermedad IPN pueden variar dependiendo del huésped afectado, el serotipo del virus y las condiciones ambientales prevalentes tales como la temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de cultivo (Roberts, 1989).

El curso de la necrosis pancreática infecciosa es normalmente severo. Los alevines de trucha afectados por IPN pueden, en extremadamente corto tiempo, mostrar

una alta tasa de mortalidad, algunas veces no es precedido por algún síntoma detectable. Según como progresa la enfermedad, la trucha afectada puede mostrar una severa taquipnea y puede algunas veces nadar en círculos o permanecer inmóvil en el fondo del estanque (Quaglio, 1989).

Los alevines con y sin saco afectados, aparecen con una pigmentación oscura, muestran exoftalmia, distensión abdominal y pseudofecas mucoides; nadan erráticamente rotando alrededor de su eje o girando violentamente. Los valores del hematocrito están disminuidos (Stoskopf, 1993).

En el examen post mortem, el estómago y primera porción del intestino aparece estático con ausencia de alimento y con mucus, a veces gelatinoso; en el recto hay un líquido amarillento acuoso. El bazo e hígado están pálidos y la vesícula biliar puede estar dilatada y repleta de bilis; el área de los ciegos pilóricos (páncreas diseminado) muestra pequeñas hemorragias petequiales (Quaglio, 1989). Hemorragias petequiales son evidentes alrededor del píloro y tejido pancreático. Células acinares pancreáticas, y ocasionalmente la cubierta lipídica, sufren necrosis masiva caracterizada por picnosis, cariorexis e inclusiones intracitoplasmáticas. El píloro, ciegos pilóricos, e intestino anterior muestran necrosis extensas. El epitelio intestinal necrótico se une con el exceso de mucus para formar un exudado catarral blanquecino (McKnight y Roberts, 1976). Cambios degenerativos también ocurren en el tejido renal hematopoyético y excretor y en el hígado. El tejido pancreático y hepático están infiltrados por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. El microscopio electrónico revela la presencia de partículas virales en tejido pancreático, hepático, renal y esplénico (Stoskopf, 1993). Las lesiones predominantes son degenerativas y necrosantes (de Kinkelin y col., 1991).

En la Necrosis Pancreática Infecciosa, la aparición hacia el cuarto día de focos de destrucción pancreática, es concomitante con la detección viral por inmunofluorescencia y justifica las manifestaciones clínicas digestivas de la enfermedad, cuya mortalidad aparece siempre algunos días después de la aparición de las lesiones pancreáticas (Swanson, 1981). El virus parece diseminarse por vía sanguínea a partir del páncreas y, aunque se puede aislar de todos los órganos, la fluorescencia no lo revela, excepto con la casi exclusividad del páncreas. La infección permanece inaparente en los sujetos que han sobrepasado la edad de los 1400 grados - día (de Kinkelin y col., 1991).

El pez que sobrevive muestra índices productivos insatisfactorios; algunos se vuelven caquéticos y el examen histológico revela un páncreas fibroso (Quaglio, 1989).

Confirmar el diagnóstico requiere aislamiento del virus en cultivo celular y su identificación basado en reactividad serológica a través de neutralización, anticuerpos fluorescentes, reacción de inmunoperoxidasa, fijación del complemento, inmunolectroforesis, coaglutinación, ELISA (Stoskopf, 1993) y PCR (González y col., 1992).

El virus de Necrosis Pancreática Infecciosa es replicado rutinariamente en líneas celulares de peces tales como, BF-2, CHSE-214, EPC y RTG-2, entre otras. Aislados de cepas Ab no crecen en la línea celular FHM y EPC. El virus IPN produce un CPE (efecto citopático celular) lítico en los cultivos celulares. Sin embargo, las líneas celulares pueden estar infectadas persistentemente y no mostrar CPE (Wolf, 1988). El CPE de IPNV se caracteriza por picnosis nuclear y un proceso de encogimiento celular de pequeñas placas visibles a 24 horas post infección para llegar a una destrucción celular total en 2 a 3 días post infección para el serotipo Sp, con una fuerte replicación (Roberts, 1989).

El virus IPN aislado de salmonídeos se replica bien a 10 - 26°C, pobremente a 4°C y no a 30°C. Aislamientos de peces no salmonídeos muestran un rango similar de temperatura, pero algunos tienen la capacidad distintiva de replicarse a 30°C (Sorimachi y Hara, 1985; Stoskopf, 1993).

El virus es usualmente aislado en peces portadores desde cerebro, riñones (especialmente la porción anterior), bazo, hígado, ciegos pilóricos y gónadas, y es eliminado con líquido seminal, ovárico y por fecas (Reichenbach - Klinke, 1982; Quaglio, 1989).

La transmisión de las virosis por el contacto directo entre peces, o por mediación del agua y de otros vectores inanimados o animados, no tienen nada de particular y la mayor parte de los virus, cuyas infecciones son transmisibles experimentalmente, se pueden transmitir de esta forma. El peligro proviene igualmente de otras especies, además de las clínicamente sensibles. Por ejemplo, las anguilas (*Anguilla anguilla*) pueden albergar un virus de IPN perfectamente patógeno para el alevín de trucha arcoiris (Castric y Chastel, 1980; de Kinkelin y col., 1991).

El virus IPN también puede ser transmitido verticalmente, a través de las ovas. Se ha establecido que el virus se localiza principalmente por fuera de la ova y que penetra al huevo durante la fecundación (Quaglio, 1989). El virus parece tener afinidad por el corion de la ova, y puede ser recuperado de las ovas con ojos tres semanas después de la infección y después de la eclosión (Ahne y Negele, 1985; Quaglio, 1989).

IPN es una enfermedad que afecta a los cultivos de peces en agua dulce y por ello las medidas de control están dirigidas a estas pisciculturas, las que deberían usar aguas superficiales independientes para el cultivo de las ovas y de alevines. El agente adherido a la superficie de la ova de trucha no elimina por enjuague con agua por lo que es necesario realizar una desinfección de las ovas con iodóforos, procedimiento que está reglamentado en el país a través del Decreto Supremo 162 de 1985 y la Resolución exenta N° 2459 de 1993 y N° 7.5 de 1996 del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Subsecretaría de Pesca (Enríquez, 1997. Comunicación Personal)*¹.

El conocimiento de la epidemiología de las virosis es de capital importancia para la prevención de ellas. En la medida que la profilaxis sanitaria sea el medio más importante para el control de estas enfermedades, puesto que las vacunas no han tenido éxito y no han aparecido otros tipos de vacunas (de Kinkelin y col., 1991), es necesario conocer la susceptibilidad de nuestros peces en cultivo a esta virosis.

Mediante la reproducción de la enfermedad "Necrosis Pancreática Infecciosa" (IPN) en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y en salmón del atlántico (*Salmo salar*), se pretende en este estudio, determinar la virulencia de las cepas VR299 y Ab del virus IPN. También es objeto de nuestro trabajo, definir las lesiones y la mortalidad que esta enfermedad produce en las especies salmonídeas de cultivo, y si el virus es transmisible vía acuática

1* Dr. R. Enríquez
Inst. Pat. Animal
Universidad Austral de Chile

4. MATERIAL Y METODO

4.1 VIRUS

En este estudio se usaron las cepas VR-299 y Ab del virus IPN. La cepa VR-299 es una cepa nacional, aislada de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y mantenida en el Laboratorio de Biología y Virología de la Universidad de Valparaíso. La cepa Ab es de origen alemán, mantenida en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.2 TITULACION

El título viral se obtuvo según haciendo diluciones seriadas del virus (Reed y Muench, 1938); para ello se colocaron 0,1 ml del virus en 0,9 ml de MEM al 2% de suero fetal, hasta llegar a la dilución 10^{-9} , luego se agregó 0,1 ml de cada una de estas diluciones a un pocillo de una microplaca de titulación que contiene una monocapa de células CHSE-214, de 12-24 horas de incubación; cada dilución se siembra en triplicado o sextuplicado, luego se esperan 2 a 3 días con un máximo de 7 días, para realizar la lectura de CPE (efecto citopático) y cálculo del título viral en TCID₅₀ / ml.

4.3 CELULAS

Se usaron las líneas celulares de peces RTG-2 y CHSE-214. La temperatura usada para la mantención y multiplicación de las células fue de 20°C y para la inoculación viral 15°C.

La inoculación se realizó en una monocapa celular que crece en un medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium), a esto se adicionó suero fetal bovino en un 10% en caso de cultivo celular y un 2% cuando se trata de inoculaciones virales. Además, se adicionaron antibióticos para limitar infecciones bacterianas, usando Penicilina y Estreptomina en concentraciones de 100 U.I./ml y 100 µg/ml de medio, respectivamente.

4.4 PRODUCCION DEL VIRUS

Se procedió a aumentar la cantidad del virus a utilizar, para realizar la infección de los peces. Para esto se utilizó una dilución viral 1:4 y se agregó a dos placas de cultivo que contenían una monocapa celular de 24 horas de incubación; la adsorción se realizó a 15°C por 1 hora.

Los títulos obtenidos y con los que se infectó el agua de la experiencia, fueron:

- Para la infección de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*):
 - cepa VR299 de IPNV: $10^{8,16}$ TCID₅₀/ ml
 - cepa Ab de IPNV : $10^{8,33}$ TCID₅₀ / ml

- Para la infección de salmón del atlántico (*Salmo salar*):
 - cepa VR299 de IPNV: $10^{7,16}$ TCID₅₀ / ml
 - cepa Ab de IPNV: $10^{6,33}$ TCID₅₀ / ml

4.5 INFECCIÓN DE ALEVINES CON IPNV.

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron 260 alevines de las especies salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y 260 alevines salmón del atlántico (*Salmo salar*), de 17 +/- 1,5 y 5 +/- 1 gramos de peso promedio, respectivamente. La experiencia se realizó en etapas separadas para cada especie, pero utilizando el mismo procedimiento y materiales en cada oportunidad. El estudio con los peces salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) se realizó en el período marzo - junio de 1996, mientras que el experimento con los peces salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se realizó en el período marzo - junio de 1997.

Los peces fueron trasladados desde las pisciculturas hasta la sala de acuarios del Laboratorio de Ictiopatología en estanques de 400 litros y con un sistema de oxigenación.

Se formaron cinco grupos de 50 peces cada uno y fueron puestos en acuarios con 70 litros de agua, en aireación constante y con un sistema de filtros de carbón activado (EHEIM 2001) para la recirculación del agua. Se dispuso de un pediluvio clorado para evitar la diseminación de la enfermedad y la infección de los peces con cualquier organismo contaminante.

Previo a la infección se tomaron 10 peces al azar de cada especie y se realizó un examen ictiopatólogico para constatar su estado de salud y descartar la presencia del virus IPN. Los peces fueron examinados tanto externa como internamente observando tamaño, peso, continuidad de la piel, pérdida de escamas, integridad de aletas, opérculos, branquias, y estado nutricional. Se sembró una muestra de riñón de cada pez en agar TSA (Agar soya-tripticase), incubándolas a 20°C por 5 días, como control bacteriano; también se hicieron tinciones gram con el mismo propósito. Se tomaron muestras de branquias, para observarlas al microscopio, chequeando su integridad, presencia de parásitos u otros. También se colectaron muestras de riñón, hígado y bazo para examen virológico que se sembraron en células RTG-2 a 15°C.

4.5.1 Inoculación experimental

Las unidades experimentales fueron clasificadas según la cepa del virus infectante y objetivo de la infección:

Unidad experimental 1 = Grupo control no infectado

Unidad experimental 2 = Grupo infectado con cepa Ab para estudio de patogenia

Unidad experimental 3 = Grupo infectado con cepa VR 299 para estudio de patogenia

Unidad experimental 4 = Grupo infectado con cepa Ab para medir mortalidad

Unidad experimental 5 = Grupo infectado con cepa VR 299 para medir mortalidad

Para la infección se utilizaron 5 baldes con 30 litros de agua a los que previamente se les instaló aireadores, se mezcló el agua con el virus, y se chequeó la temperatura del agua. Cada unidad experimental utilizó su propio balde donde se mantuvieron durante una hora (tiempo de exposición).

Después de la infección, los grupos de peces infectados fueron traspasadas a otros baldes para enjuagar la superficie externa de los peces, antes de llevarlos a los acuarios. La temperatura del agua al momento de la infección fue de 17°C en la infección de ambas especies.

Luego del traslado, se tomó una muestra de agua de los baldes con el virus para la titulación; tras lo cual se procedió a desinfectar todo el material empleando cloro. Se

dejó a los alevines sin alimento hasta el día siguiente. Posteriormente fueron alimentados con una dieta comercial al 1,5% del peso corporal / día.

Los títulos virales logrados en el agua post infección, fueron los siguientes:

- Agua de infección de peces salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*):
 - cepa VR-299 de IPNV: $10^{6,83}$ TCID₅₀/ml
 - cepa Ab de IPNV: $10^{6,0}$ TCID₅₀/ml

- Agua de infección de peces salmón del atlántico (*Salmo salar*):
 - cepa VR-299 de IPNV: $10^{5,0}$ TCID₅₀/ml
 - cepa Ab de IPNV: $10^{5,0}$ TCID₅₀/ml

4.5.2 Muestreo de peces

4.5.2.1 Estudio de mortalidad

Los grupos infectados con las cepas Ab y VR-299 para medir mortalidad (unidades experimentales 4 y 5) permanecieron en los acuarios hasta el término de la experiencia, y sólo se retiraron los peces muertos/moribundos, realizándoles un examen virológico para constatar la presencia del virus a través de cultivo celular (RTG-2), y posteriormente se confirmó la presencia de IPNV mediante el test de inmunofluorescencia indirecta (IFAT-IPNV) en las impresiones de órganos de estos peces.

Durante el tiempo que duró la experiencia (1 - 45 días) se observaron y registraron las características de comportamiento, signos clínicos presentes en los peces, tanto externa como internamente.

4.5.2.2 Estudio de patogenia

La toma de las muestras de peces infectados fue dividida en dos etapas. La primera, tendiente a observar la patogenia viral, y a pesquisar el desarrollo de la signología clínica, comprendió los primeros 10 días en que se sacrificaron al azar dos peces diariamente.

En la segunda etapa se observó el desarrollo del estado portador; para ello se muestrearon 5 peces cada 5 días a partir del día 15, y hasta el día 45 post - infección.

El grupo de peces salmón atlántico infectados con la cepa Ab del virus IPN (unidad experimental 2), fue sacrificada en su totalidad el día 25, debido a la presentación de una micosis cutánea que afectó a la mayoría de los peces.

4.5.3 Muestreo de órganos

Se realizó necropsia a todos los peces infectados con las cepas Ab y VR-299, obteniendo las siguientes muestras:

- Bazo, hígado y riñón para examen virológico.
- Bazo y riñón para IFAT (test de inmunofluorescencia indirecta).
- Ciegos pilóricos, hígado, bazo y riñón para el estudio histopatológico.

4.5.3.1 Examen virológico

Para este examen, las muestras se obtuvieron con la máxima esterilidad posible y se mantuvieron en hielo. Se sacaron pequeños trozos de bazo, hígado y riñón y se colocaron en un tubo con medio de cultivo MEM al 2% de suero fetal y con 4 veces la concentración de antibióticos para impedir una infección bacteriana, a una dilución de 1:10.

Las muestras del grupo y del mismo día se mezclaron y se trabajó con un pool. Se maceró la muestra en un mortero adicionando arena estéril para facilitar el triturado, el contenido se centrifugó a 3500 r.p.m.; luego se recuperó el sobrenadante y se congeló en tubos rotulados para su posterior utilización.

Posteriormente el sobrenadante se inoculó en una monocapa celular (RTG-2) realizando la adsorción a 15°C por 1 hora, y luego se observó el efecto citopático diariamente por 7 días, confirmando así la presencia del virus.

4.5.3.2 IFAT-IPNV (Test de inmunofluorescencia indirecta para IPNV)

De todos los peces infectados con las cepas Ab y VR 299, se colectaron muestras de bazo y riñón, con las que se hizo una impresión de estos tejidos sobre un portaobjetos, luego se fijó con acetona por 10 minutos, y se guardó en congelación.

Este método se usó además para confirmar los resultados positivos del examen virológico, utilizando un kit comercial para la detección de IPN (BioX)².

4.5.3.3 Examen histopatológico

De cada pez se sacaron muestras de riñón, hígado, bazo y ciegos pilóricos y se guardaron separadamente en frascos con formalina al 10%, permaneciendo allí hasta que se eligieron las muestras positivas que se enviaron al Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile para su observación.

²® BioX, Bio-Fluo IPN
30 Hoogveldlaan
1700 Dilbeek, Bélgica.

5. RESULTADOS

5.1 INFECCIÓN DE ALEVINES CON IPNV

5.1.1 Sintomatología de peces infectados

La sintomatología clínica tanto en salmón coho como en salmón del atlántico infectados con las cepas Ab y VR-299 del virus IPN fue poco manifiesta. En ambas especies los signos clínicos observados fueron:

- inapetencia y decaimiento de los peces, estos permanecían en el fondo del acuario y se alimentaban escasamente.
- externamente presentaron oscurecimiento de la piel, exoftalmia leve, palidez branquial, aletas raídas y en algunos peces se observó distensión abdominal (Foto : 1).
- internamente se observó el estómago e intestino sin alimento, el hígado pálido y la vesícula biliar llena de bilis.



Foto 1: *S. salar* infectados vía baño con IPNV-VR 299. Se observa distensión abdominal y melanosis.

5.1.2 Mortalidad

En la tabla 1 se presenta la mortalidad en s. coho producida por el virus IPN con las cepas Ab y VR 299.

Tabla 1: Mortalidad diaria de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) de 17+/- 1.5 gr infectados vía baño con virus IPN a 17°C.

Día post infección	Grupo control no infectado	Grupo infectado cepa Ab	Grupo infectado cepa VR 299
4	-	-	6
5	-	-	7
6	-	-	1
7	-	-	1
8	-	-	1
20	-	-	1
Total	-	-	17

En esta tabla se presentan los días en que se encuentran peces moribundos/muertos. Se observa que sólo la cepa VR 299 produjo mortalidad en los alevines salmón coho. De un total de 50 peces murieron 17 lo que representa un 34%. La mortalidad de este grupo de alevines se concentró principalmente entre los días 4 y 8 post infección, y al día 20 aparece el último pez muerto (Gráfico 1).

Los peces salmón coho infectados con la cepa Ab del virus IPN no mostraron mortalidades

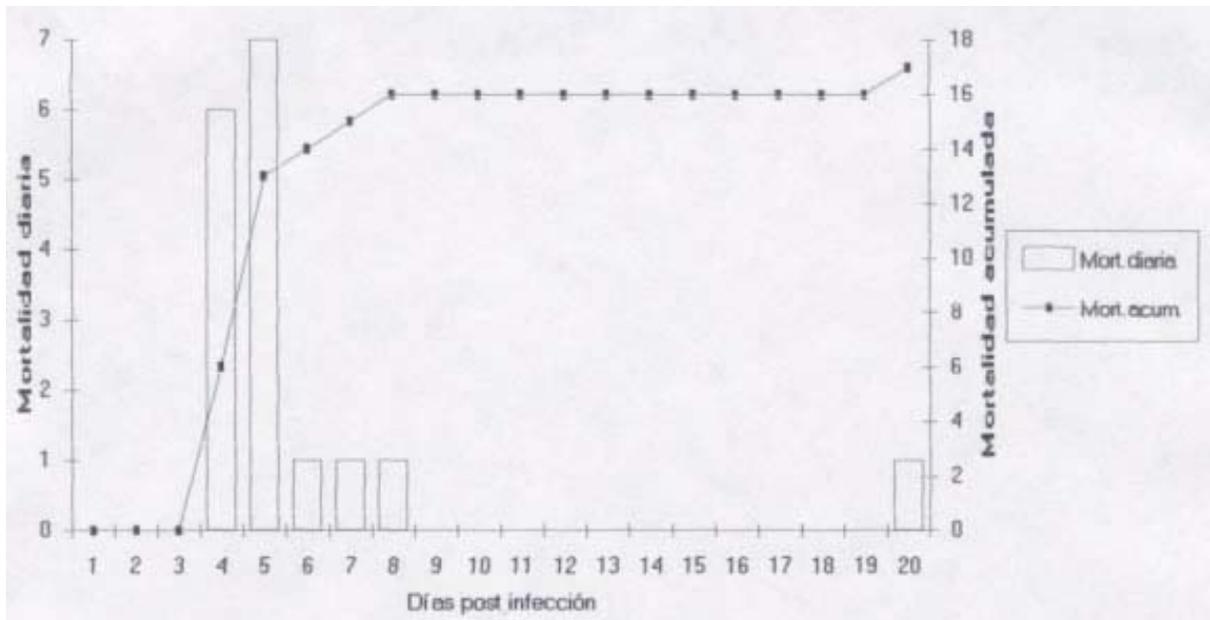


Gráfico 1: Mortalidad diaria y acumulada de peces salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), infectados con la cepa VR 299 del virus IPN a 17°C.

De todos los peces moribundos/muertos se logró el reaislamiento del virus IPN VR 299 a través de células RTG-2 y se confirmó mediante IFAT-IPNV específica observada en las impresiones de órganos de estos peces.

En la tabla 2 se presenta la mortalidad de los alevines salmón atlántico, infectados con la cepa Ab y VR 299 del virus IPN.

Tabla 2: Mortalidad diaria de salmón del atlántico (*Salmo salar*) de 5 +/- 1 gr, infectados con el virus IPN cepas Ab y VR 299 a 17°C

Día post infección	Grupo control	Grupo infectado cepa Ab	Grupo infectado cepa VR 299
6	-	-	1
9	-	-	2
10	-	-	2
14	-	-	2
20	-	1	3
23	-	3	3
24	-	-	3
25	-	-	4
26	-	ND*	-
27	-	ND	-
Total	-	4	20

*ND = no determinado

En esta experiencia murieron peces infectados con ambas cepas del virus, en el grupo infectado con la cepa Ab murieron 4 alevines (8%), que se presentaron entre los días 20 a 23. En el grupo infectado con la cepa VR 299 murieron 20 alevines (40%) concentrándose la mortalidad entre los días 6 al 25 post infección.

De todos los salmón atlántico moribundos/muertos se aisló el virus IPN a través de células RTG-2 y se confirmó mediante IFAT-IPNV específica en los órganos de estos peces.

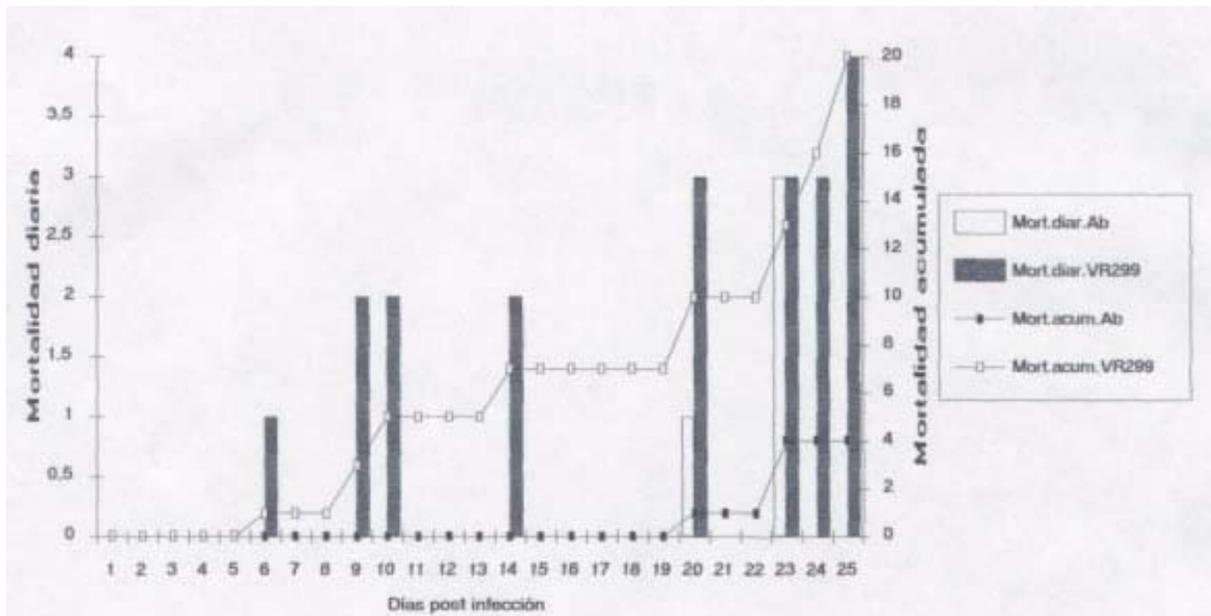


Gráfico 2: Mortalidad diaria y acumulada de peces salmón del atlántico (*Salmo salar*), infectados con la cepa Ab y VR 299 del virus IPN a 17°C.

5.2 PATOGENIA

5.2.1 Examen virológico de las muestras de peces colectadas diariamente

De los dos peces/día que se tomaron al azar de la unidad experimental 2 y 3, se pesquizó el virus IPN cepas Ab y VR 299 en la línea celular RTG-2, según muestra la tabla 3.

Tabla 3: Muestras de salmón coho (*Oncorhynchm kisutch*) con efecto citopático en células RTG 2 producto de la replicación del virus IPN.

Día post inoculación	Muestras de peces infectados cepa Ab	Muestras de peces infectados cepa VR 299
1	-	-
2	+	+
3	-	+
4	+	+
5	-	+
6	-	-
7	-	+
8	-	+
9	-	+
10	+	-
15	-	-
20	-	+
25	-	-
30	-	-
35	-	-
40	-	-
45	-	-
Total	3	8

Se encontraron sólo tres muestras positivas del grupo infectado con la cepa Ab, en los días 2, 4 y 10; y 8 muestras positivas del grupo infectado con la cepa VR-299 agrupándose entre los días 2 al 20.

Se logró reaislar el virus en cultivo de células RTG 2, observándose los primeros signos de destrucción celular a las 48 horas después de infectar la monocapa. Las células se separan, se alargan y se pierde la estructura de monocapa, visualizándose espacios vacíos entre ellas (Foto 2 y 3).

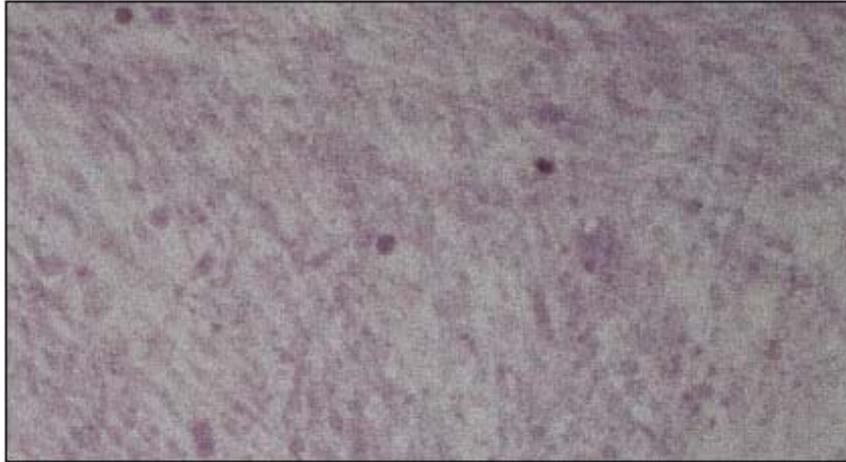


Foto 2: Monocapa de RTG-2 no inoculada con el virus IPN (Giemsa 48 x).

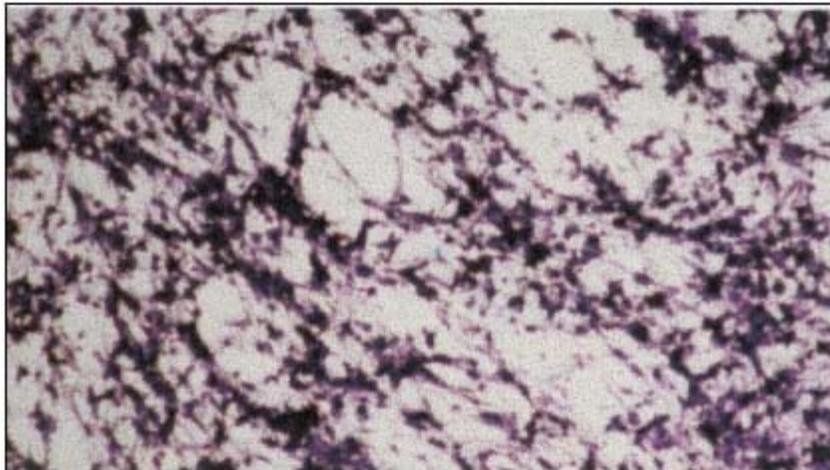


Foto 3: Monocapa de RTG-2 con CPE producto de la replicación del virus IPN, después de inocular órganos de peces infectados con IPNV-VR 299 (Giemsa 48 x).

Tabla 4: Muestras de salmón del atlántico (*Salmo salar*) con efecto citopático en RTG 2 producto de la replicación del virus IPN.

Día post inoculación	Muestras de peces infectados cepa Ab	Muestras de peces infectados cepa VR 299
1	-	-
2	-	-
3	-	+
4	-	-
5	-	-
6	+	+
7	-	-
8	+	-
9	+	+
10	+	-
15	+	+
20	+	+
25	-	+
30	ND*	-
35	ND	-
40	ND	-
45	ND	-
Total	6	6

*ND = no determinado

Se encontraron seis muestras positivas con CPE del grupo infectado con la cepa Ab entre los días 6 y 20 post infección; y seis muestras positivas del grupo infectado con la cepa VR 299 del virus IPN entre los días 3 y 25 post infección.

5.2.2 IFAT-IPNV (Test de inmunofluorescencia indirecta)

Este test fue usado como método confirmativo de la infección viral en los peces y fue realizado en los días que indica la Tabla 5 a las impresiones de riñón de salmón coho,

Tabla 5: IFAT-IPNV realizado a los imprinting de riñón de peces salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) muestreados en los días que se indica.

Día post infección	Imprinting de riñón de peces infec. con cepa Ab	Imprinting de riñón de peces infec. con cepa VR299
2	+	-
3	-	-
4	+	+
5	-	+
7	-	+
8	-	+
9	-	+
10	+	-
20	-	+
Total	3	6

Tres imprinting de riñón de los peces infectados con la cepa Ab fueron encontrados positivos, estos corresponden a los días 2, 4, y 10 post infección; y seis muestras del grupo infectado con la cepa VR 299 que corresponden a los días 4, 5, 7, 8, 9, y 20 post infección.

Tabla 6: IFAT-IPNV realizado a las impresiones de riñon de peces salmón del atlántico (*Salmo salar*) muestreados en los días que se indica.

Día post infección	Impresiones de riñón de peces infectados cepa Ab	Impresiones de riñón de peces infectados cepa VR299
3	-	+
6	+	+
8	+	-
9	+	+
10	+	-
15	+	+
20	+	+
25	-	+
Total	6	6

Se encontraron seis impresiones positivas de los peces infectados con la cepa Ab, los días 6, 8, 9, 10,15 y 20 p.i.. Lo mismo ocurrió en los imprinting de peces infectados con la cepa VR 299, en los días 3, 6, 9, 15, 20 y 25 post infección.

5.2.3 Examen histopatológico.

5.2.3.1 Alevines salmón coho (*Oncorhynchm kisutch*) infectados con la cepa Ab del virus IPN.

- **Ciegos pilóricos:** El epitelio evidencia numerosas células caliciformes, con abundante mucus y detritus celular en el lumen.
- **Páncreas:** Múltiples células acinares presentan signos de necrosis (picnosis nuclear) y pérdida de la ubicación apical de los granulos de zimógeno.
- **Hígado:** Congestión sinusoidal leve con necrosis aislada de los hepatocitos.

Diagnóstico histopatológico: apoptosis hepática y pancreática.

5.2.3.2 Alevines salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados con la cepa VR 299 del virus IPN.

- **Riñón:** Se observa un aumento moderado de las células melanomacrofágicas. Los glomérulos presentan abundante material proteico en el espacio de Bowman y en los lúmenes tubulares.
- **Bazo:** Se presenta un incremento focal de células melanomacrofágicas y predominio difuso de células reticulares.
- **Ciegos pilóricos:** Estas estructuras no presentan alteración.
- **Páncreas:** Necrosis focal de células acinares, acompañada de elementos histiocitarios en escasa cantidad.
- **Hígado:** Necrosis de hepatocitos en forma aislada, los cuales presentan eosinofilia citoplasmática y picnosis nuclear.

Diagnóstico histopatológico: nefrosis leve; apoptosis hepática y pancreática.

5.2.3.3 Alevines salmón del atlántico (*Salmo salar*) infectados con la cepa Ab del virus IPN.

- **Ciegos pilóricos:** Normales.
- **Páncreas:** Necrosis aislada de células acinares, acompañadas de formaciones quísticas de secreción.
- **Hígado:** Presenta una moderada tumefacción turbia de los hepatocitos, algunos de los cuales presentan eosinofilia citoplasmática y picnosis nuclear. Además, llama la atención, la proliferación de células de Küpffer.

Diagnóstico histopatológico: apoptosis hepática y pancreática.

5.2.3.4 Alevines salmón del atlántico (*Salmo salar*) infectados con la cepa VR 299 del virus IPN.

- **Riñón:** El tejido hematopoyético evidencia incremento de las células melanomacrofágicas. Los epitelios tubulares presentan degeneración hialina en gota en grado leve y proteínas en el lumen. Los glomérulos incluyen abundante material proteico en el espacio de Bowman, el cual desplaza y comprime el ovillo glomerular.
- **Ciegos pilóricos:** Se presentan con un infiltrado difuso y leve en el corion de la mucosa.
- **Páncreas:** Algunas células de los acinos pancreáticos evidencian signos de necrosis (cariorrexis).
- **Hígado:** Presenta necrosis aislada de múltiples hepatocitos, los cuales evidencian eosinofilia citoplasmática, cariorrexis y picnosis nuclear.

Diagnostico histopatológico: apoptosis hepática y pancreática y una nefrosis leve.

6. DISCUSION

Este estudio sobre la virulencia de las cepas Ab y VR-299 del virus IPN en las especies s. coho y s. atlántico, es el primero realizado en Chile, por lo que nos es imposible comparar nuestros resultados a nivel nacional. Sólo se ha comunicado la presencia de la cepa VR-299 que afectó a cultivos de truchas en nuestro territorio (Mac Allister y Reyes, 1984)

Este estudio se realizó para evaluar la susceptibilidad de las otras dos especies de cultivo en el país, como con salmón coho y salmón atlántico.

Después de infectar los alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón del atlántico (*Salmo salar*) con las cepas Ab y VR 299 del virus IPN, se desarrolló una signología clínica poco manifiesta e inespecífica, observándose inapetencia, decaimiento, oscurecimiento de la piel, exoftalmia leve, y palidez de branquias.

Según de Kinkelin y col. (1991) la inapetencia y la anorexia son las primeras manifestaciones clínicas, seguidas de astenia que conduce a los peces a dejarse arrastrar por la corriente, a refugiarse en las zonas en calma, a reposar en el fondo y a reducir su actividad motriz.

Los signos de la Necrosis Pancreática Infecciosa pueden variar dependiendo de la especie afectada, del serotipo del virus y las condiciones medioambientales, como la temperatura del agua, contenido de oxígeno del agua y densidad de la población (Roberts, 1989). En este estudio la signología clínica poco manifiesta puede explicarse por el tamaño de los peces (5 - 17 grs.), ya que la edad de mayor susceptibilidad es durante la primera alimentación (Fenner y col., 1993), como también la temperatura del agua en esta experiencia que fue de 17°C, en el rango superior a la acción del virus IPN (Quaglio, 1989).

En la infección de alevines s. coho con ambas cepas del virus IPN utilizadas, la cepa VR-299 fue notoriamente más virulenta alcanzando un 34% de mortalidad (17/50), mientras que no se presentó mortalidad de peces en el grupo infectado con la cepa Ab, lo que indica que la cepa Ab es avirulenta para los alevines s. coho de 17 gramos. Estos resultados se deben principalmente a la baja virulencia de la cepa Ab (Quaglio, 1989), en cambio la cepa VR-299 fue capaz de provocar una mortalidad significativa en los alevines a pesar del tamaño de estos.

En la infección de peces s. atlántico (*Salmo salar*) murieron alevines infectados con ambas cepas del virus. En aquellos infectados con la cepa VR 299 se obtuvo una

mortalidad del 40% (20/50) entre los días 6 y 25. En los peces infectados con la cepa Ab la mortalidad alcanzó un 8% (4/50) en los días 20 y 23. Esto muestra claramente la mayor virulencia de la cepa VR-299, capaz de provocar una mortalidad significativa, a diferencia de la cepa Ab, que produjo una mortalidad notoriamente menor. Los resultados obtenidos son similares a los logrados en otros estudios donde se ha demostrado que los efectos provocados por IPNV, dependen de la virulencia de la cepa del virus. Las tasas de mortalidad obtenidas en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron 50% (cepa Sp), 25-29% (cepa Ab) y 0% (cepa He) (Ahne y col, 1989). Frantsi y Savan, 1971 estudiaron la virulencia de la cepa CR-299 en trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y obtuvieron una mortalidad de 31% a 15,5 °C y 12% a 4,5°C.

La patogenicidad de IPNV en *Salmo salar*, según Swanson y Gillespie (1979) es un asunto muy discutido, ya que la enfermedad ha sido sólo inducida en el laboratorio y en forma subclínica, sin embargo se han realizado estudios epidemiológicos donde se demuestra que el riesgo de smolts *Salmo salar* a desarrollar IPN en agua de mar es 2,9 veces mayor, cuando se mezclan grupos de diferente origen. Otros factores que afectan en un brote de IPN en agua marina es el estrés causado por el transporte cuando los smolts son transferidos al agua de mar (Stangeiand y col., 1996).

Parisot y col.(1963) reportaron que el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) son resistentes a la enfermedad cuando son inoculados con el virus, pero no se presentan detalles acerca de la edad o tamaño de los peces. Wolf y Pettijohn (1970) señalaron que el IPNV también ha sido aislado de alevines s. coho. Sin embargo las especies más afectadas son las truchas (Roberts, 1982).

El estudio de patogenia en esta experiencia se hizo en base a exámenes virológicos de peces moribundos/muertos, que fueron confirmados con IFAT-IPNV, y de exámenes histopatológicos realizados a las muestras de órganos de peces infectados con las cepas Ab y VR-299 del virus IPN.

En el examen virológico que se hizo a las muestras de s. coho se logró reaislar el virus en 3 muestras del grupo infectado con la cepa Ab en los días 2, 4 y 10; y 8 muestras del grupo infectado con la cepa VR-299 entre los días 2 al 20. De esta forma pudimos verificar que el virus IPN fue capaz de infectar a estos peces, y que hubo una diferencia notoria entre las cepas usadas, ya que la cepa Ab se replicó mucho menos que la cepa VR-299. Sin embargo la cepa Ab logró replicarse en cultivo celular a pesar de no haber producido mortalidad, lo que demuestra que los peces se infectaron.

Se observa además, que desde el día 2 posí infección hay partículas replicantes, capaces de producir un marcado CPE en el cultivo celular de RTG-2 en ambas cepas,

ya que en el día 1 post infección no se presentó CPE, probablemente debido a la baja cantidad del virus infectante presente en los órganos de estos alevines.

En los peces s. atlántico se reaisló el virus en cultivo celular, en 6 muestras de peces infectados con la cepa Ab entre los días 6 y 20, y en 6 muestras de peces infectados con la cepa VR-299 entre los días 3 y 25. Esto indica que en estos peces de 5 grs. promedio, las cepas Ab y VR-299 del virus IPN fueron capaces de replicarse, desde el día 6 y 3, respectivamente.

En el estudio del estado portador de s. coho la cepa Ab se mantuvo hasta el día 10 post-infección, y la cepa VR-299 se mantuvo hasta el día 20, después de estos días ya no es posible observar el estado portador. En los peces s. atlántico la cepa Ab se mantuvo hasta el día 20, y la cepa VR-299 se mantuvo hasta el día 25 post infección. Esto indica que el virus se mantiene en los peces dependiendo de la cepa y de la susceptibilidad de la especie, ya que Ab es menos virulenta, y s. atlántico es más susceptible según nuestros resultados.

Según Roberts (1989), después de infecciones experimentales en trucha arcoiris y trucha café, por contacto en el agua o por infección intraperitoneal, el virus puede ser aislado después de 40 días post infección desde plasma y leucocitos periféricos.

Los peces utilizados en la experiencia tenían una edad promedio de 8 meses, lo que hace que sean menos susceptibles. Los s. atlántico sin embargo, pesaron 12 grs menos, debido a diferencias de temperatura en las condiciones de su cultivo. Dorson y Torchy (1981) realizaron un estudio sobre el efecto de la edad en el aumento de la resistencia de la trucha arcoiris al IPN. Las mortalidades acumulativas dentro de 2 meses de infección decrecieron notablemente desde un 70% en peces infectados cuando tenían de 1 a 2 semanas de edad, a un porcentaje omitible en peces infectados a las 20 semanas de edad. Los autores concluyen que usando la mortalidad como un criterio, la trucha arcoiris deja de ser susceptible al IPN cuando tiene de 15 a 20 semanas de edad. Sin embargo, aún puede ser activamente infectado en una siguiente exposición al virus (Roberts, 1982). Con el aumento de la edad, la infección se hace subclínica (Fenner y col., 1993). Se ha descrito en trucha arcoiris un factor sérico denominado 6S por su coeficiente de sedimentación que neutraliza al virus IPN y posiblemente este puede encontrarse en el suero de otras especies salmonídeas (Dorson y deKmkelm, 1974).

Todas las muestras con resultados positivos en el cultivo celular fueron confirmadas mediante inmunofluorescencia indirecta. Los IFAT-IPNV realizados a los imprinting de riñón de peces s. coho infectados con la cepa Ab fueron positivos los días 2, 4 y 10, confirmando así los resultados obtenidos en el examen virológico. Mientras

que los imprinting de los peces infectados con la cepa VR-299 fueron positivos los días 4, 5, 7, 8, 9 y 20. Sin embargo, las muestras de los días 2 y 3 infectados con la cepa VR 299 fueron positivas en el cultivo celular y los imprinting de estos peces dieron resultados negativos en el IFAT-IPNV, debido posiblemente a la baja cantidad de partículas virales presentes.

Las técnicas de anticuerpo fluorescente, directa o indirecta, son el segundo método más usado para la identificación serológica de IPNV. El método indirecto ha sido usado por Vestergard Jorgensen (1974), Nishimura (1980), Swanson (1981), Swanson y Gillespie (1981). Ishiguro y col.,(1984). El test puede ser realizado dentro de 90 minutos y es un buen método para la detección de peces portadores (Wolf, 1988).

En el estudio histopatológico realizado a las muestras de hígado, bazo y riñón, de s. coho y s. atlántico, encontramos signos de necrosis celular provocada por la infección viral. La Necrosis Pancreática Infecciosa se manifiesta esencialmente por una localización pancreática bajo la forma de focos confluentes (de Kinkelin y col., 1991). En nuestro estudio se observaron signos leves de necrosis en células acinares del páncreas, indiferentemente en las muestras de peces infectadas con la cepa Ab y VR-299 de ambas especies estudiadas.

El páncreas de s. coho infectado con la cepa Ab, presenta múltiples células acinares con picnosis nuclear, y el páncreas de los peces infectados con la cepa VR-299 presenta necrosis focal de células acinares, acompañada de elementos histiocitarios en escasa cantidad.

Algo similar ocurre en el páncreas de s. atlántico infectado con la cepa Ab, en el que se observa necrosis aislada de células acinares, acompañadas de formaciones quísticas de secreción. Los peces infectados con la cepa VR-299 evidencian signos de necrosis (cariorrexis). Según, Kudo y col.(1973), las células acinares pancreáticas y ocasionalmente el tejido aislante sufre necrosis masiva caracterizada por picnosis, cariorrexis e inclusiones intracitoplasmáticas. Esto concuerda con Wolf (1988), respecto a que las células acinares afectadas muestran núcleos picnóticos e inclusiones citoplasmáticas basófilas, estas inclusiones, sin embargo, son producto de una desintegración celular y no es una inclusión viral verdadera.

Otro órgano que presentó características de daño producido por IPN fue el hígado. En los peces s. coho infectados con la cepa Ab se observa una congestión sinusoidal leve con necrosis aislada de hepatocitos. El hígado de los peces infectados con la cepa VR-299 muestra necrosis de hepatocitos en forma aislada, los cuales presentan eosinofilia citoplasmática y picnosis nuclear.

En los peces s. atlántico infectados con la cepa Ab, el hígado presenta una moderada tumefacción de los hepatocitos, algunos de los cuales muestran eosinofilia citoplasmática y picnosis nuclear. Lo mismo ocurre en el hígado de los peces infectados con la cepa VR-299, que muestra necrosis aislada de hepatocitos, los que evidencian eosinofilia citoplasmática, cariorrexis y picnosis nuclear. Swanson y Gillespie (1979) observaron una degeneración focal de células parenquimatosas del hígado en alevines de Salmón del atlántico (*Salmo salar*) que fueron inoculados con la cepa VR 299 de IPNV.

Los riñones de los peces s. coho presentan un aumento moderado de las células melanomacrofágicas. Los glomérulos presentan abundante material proteico en el espacio de Bowman y en los lúmenes tubulares. En los peces s. atlántico también se evidencia un incremento de las células melanomacrofágicas y los epitelios tubulares presentan degeneración hialina y proteínas en el lumen. Wolf y Quimby (1971) describen un daño renal en trucha arcoiris, donde se evidencia congestión en glomérulos, edema y destrucción o descamación del epitelio tubular.

El diagnóstico histopatológico de los peces salmón coho y salmón atlántico es: nefrosis leve, apoptosis hepática y pancreática. Todos estos cambios degenerativos que presentaron los órganos, son atribuibles a la presencia del virus IPN en los peces infectados.

Con los resultados obtenidos en nuestros exámenes, concluimos que es posible reproducir la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa en los alevines salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y salmón atlántico (*Salmo salar*) con ambas cepas, y que por lo tanto estas especies son susceptibles al virus IPN a 17°C. Se observan diferencias de virulencia entre las cepas, y entre las especies estudiadas, influenciada en gran medida por el tamaño de los peces infectados.

7. BIBLIOGRAFIA

- AHNE, W. y R. NEGELE.** 1985. Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonids fish. Fish and shellfish pathology. Academic Press, London. pp 261-269.
- AHNE, W., I. SCHWANZ-PFITZNER, y I. THOMSEN.** 1987 Serological identification de 9 viral isolates from european eels *Anguilla anguilla* with stomatopapilloma by means of neutralization test. Sonderdruck aus Journal of applied ichthyology 1: 30-32.
- AHNE, W., R. K. KELLY y H. J. SCHLOTFELDT.** 1989 Fish Health Protection Strategies. Ed. Lillelund, K. y H. Rosenthal. Hamburg, Bonn, Germany.
- AMEND, D. F. y J. P. PIETSCH.** 1972. An improved method for isolating viruses from asymptomatic carriers fish. Trans. Am. Fish Soc. 101: 267-269.
- AVILÉS, H.** 1997. Ante acusación a salmoneros: Férrea defensa nacional. Revista Campo Sureño 692: 10-12. Lunes 14 de julio.
- CASTRIC, C. J. y C. CHASTEL.** 1980. Isolation and characterization attempts of 3 viruses from european eels *Anguilla anguilla*: preliminar results. Annls. Virol. (Inst. Pasteur) 131: 435-448.
- DE KINKELIN, P., Ch. MICHEL, y P. GHITTINO.** 1991 Tratado de las enfermedades de los peces. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- DOBOS, P., B. J. HILL, R. HALLET, D, T. C. KELLS, H. BECHT, y D. TENINGES.** 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. J. Virol. 32: 593-605.
- DORSON, M. y P. de KINKELIN.** 1974. Nécrose pancréatique infectieuse des salmonides: existence dans le sérum de truites indemnes d'une molécule 6S neutralisant específiquement le virus. C. R. Acad. Sci. 278: 785-788.

- DORSON, M. y C. TORCHY.** 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout. *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish Dis. 4: 213-221.
- DORSON, M.** 1982. Les antigènes des micro-organismes pathogènes des poissons. Symposium International de Tailloires. Ed. D.P. Anderson, M. Ph. Dubourget. pp.7-31.
- DORSON, M., P. de KINKELIN, C. TORCHY y D. MONGE.** 1987 Sensibilité du brochet (*Esox lucius*) a différents virus de salmonidés (NPI, SHV, NHI) et au rhabdovirus de la perche. Bull. fr. Peche Piscic. 307: 91-101.
- ELLIOT, D. G. y D. F. AMEND.** 1978. Efficacy of certain desinfectaras againt infectious pancreatic necrosis virus. J. FishBiol. 12: 277-286.
- FENNER, F., E. P. GIBBS, F. MURPHY, R. ROTT, M. STUDDERT y D. WHITE.** 1993. Veterinary Virology. Ed Academic Press, INC. San Diego, California.
- FRANTSI, C., y M. SAVAN.** 1971. Infectious pancreatic necrosis virus: comparative frequencies of isolation fron feces and organ of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Fish. Res. Board Can.28: 1064 - 1065.
- GONZALEZ, M., M. A. GANGA y A. M. SANDINO.** 1992 Utilización de una sonda sintética para la detección del virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV). En: XV Congreso Chileno de Microbiología.
- HILL, B.** 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In Microbial Diseases of Fish, Ed. R. J. Roberts. Academic Press. London
- HILL, B.** 1992. Impact of viral disease of salmonid in fish in European Community. Proc.OJI Int. Symp. Salmonid Dis.: 48-59.
- ISHIGURO, S., H. ISAWA, H. KODAWA, M. ONUMA y T. MIKAMI.** 1984. Serological relationships among five strains of infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish. Dis. 7: 127-135.

- KUDO, S., I. KUNIMENI, K. NABUSAWA y S. KABAYASHI.** 1973 Electron microscopic observations of the pancreas and liver in the fingerlin rainbow trout with symptom of IPN. Ipn. I. Ichthyol. 20: 163-177.
- LJUNGBERG, O. y P. E. V. JORGENSEN.** 1972. Infectious pancreatic necrosis of salmonids in Swedish fish farms. Eifac 72/SC II - Symposium 14.
- Mac ALLISTER, P.E., X. REYES.** 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, imported into Chile. J. Fish Dis. 7: 319-322.
- Mc KNIGHT. I. J. y R. J. ROBERTS.** 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. 1. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. Br. Vet. J. 132: 76-86.
- MENDEZ R., y C. MUNITA .** 1989. La salmonicultura en Chile. Ed. Fundación Chile Santiago, Chile.
- MIMS, C. A. y D. O. WHITE.** 1984. Viral pathogenesis and immunology. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- NISHIMURA, T.** 1980. Rapid diagnosis of viral diseases of salmonids. Fish Pathol. 14: 191-197.
- OKAMOTO, N., T. SANO, R. P. HEDRICK y J. L. FRYER.** 1983 Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and european eels virus. J. Fish Dis. 6: 19-25.
- PARISOT, T. J., W. T. YASUTAKE, y V. BRESSLER.** 1963 A new geographic and host record for infectious pancreatic necrosis. Trans. Am. Fish. Soc. 91: 63- 66.
- PERES V.** 1996. Chile en el Mercado Europeo. Aquanoticias Internacional 30: 59
- QUAGLIO, F.** 1989. Infectious disease from birnavirus with particular reference to infectious pancreatic necrosis of salmonids. Riv. Ital. Acquacol 24: 167-179.
- REED, L. H. y MUENCH.** 1938. A simple method for stimating fifty percents and points. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

- REICHENBACH-KLINKE, H.** 1982. Infectious Pancreatic Necrosis IPN. En enfermedades de los peces. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp 92-96.
- ROBERTS, R.** 1982: Microbial diseases of fish. Universidad de Stirling, Escocia, UK.
- ROBERTS, R.** 1989. Fish pathology. Ed. Bailliere Tindall, London.
- SANO, T.** 1973. Studies on viral diseases of japanese fishes IV infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: Susceptibility of freshwater salmon of the genus *Oncorhynchus*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 39: 117-120.
- SANO, T., K. TANAKA y S. FUKUSAKI.** 1981. Immune response in adult trout against formalin killed concentrated IPNV. Rev. Biol. Stand. 49: 63-70.
- SANO, T.** 1995. Viruses and viral diseases of salmonids. Aquaculture 132: 43-52.
- SORIMACHI, M. y T. HARA.** 1985. Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlins showing ascites. Fish Pathol. 19: 231-238
- STOSKOPF, M.** 1993. Fish Medicine. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia.
- STANGELAND, K., S. HOIE y T. TAKSDAL.** 1996. Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in atlantic salmon, (*Salmo salar*) L., post - smolts. J. of Fish Dis. 19: 323-327.
- SWANSON, R. N. y J. H. GILLESPIE.** 1979. Pathogenesis of IPN in Atlantic salmon (*Salmo salar*), J. Fish Res. Bd. Can. 36: 587-591.
- SWANSON, R. N.** 1981. Use of the indirect fluorescent antibody test to study the pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in trout. Dev. Biol. Stand 49: 71-77.
- SWANSON, R. N. y J. H. GILLESPIE.** 1981. An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues. J. Fish. Dis. 4: 309-315.
- VESTERGARD-JORGENSEN, P. E. y N. P. KEHLET.** 1971 Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout. Nord. Vet. Med. 23: 568- 575

- VESTERGARD-JORGENSEN, P. E.** 1974. A study of viral diseases in Danish rainbow trout. Their diagnosis and control. Ed. Cari Fr. Mortensen. Copenhagen.
- WEDEMEYER, G.A., N. C. NELSON y C. A. SMITH.** 1978 Survival of the salmonid viruses infectious hematopoietic necrosis (IHNV) and infectious pancreatic necrosis (IPNV) in ozonated, chlorinated and untreated waters. J. Fish Res. Board Can. 35: 875-879.
- WOLF, K., S. F. SNIESZKO, C. E. DUMBAR, y E. PYLE.** 1960 Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 104: 05-108.
- WOLF, K. y L. PETTIJOHN.** 1970. Infectious pancreatic necrosis virus isolated from coho salmon fingerlings. Prog. Fish-Cult. 32: 17-18.
- WOLF, K. y M. C. QUIMBY.** 1971. Salmonids viruses: infectious pancreatic necrosis virus morphology, pathology, and serology of first European isolations. Arch. Gesamte Virus-forsch 34: 144-156.
- WOLF, K.** 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Ed. Ithaca, New York, USA.
- YAMAMOTO, T., y K. M. SHANKAR.** 1992. The spread of infectious pancreatic necrosis virus from localized natural carrier populations and epidemiologic analysis by selected monoclonal antibodies. Fish Health Section, Asian Fisheries Society. pp. 253-265.
- YOSHIMIZU. M., H. TAKIZAWA, Y. KAMEI y T. KIMURA.** 1986 Interaction between fish pathogenic viruses and microorganisms in fish rearing water: Survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus, infectious haematopoietic necrosis virus and *Oncorhynchus masou* virus in rearing water. Fish Pathol. 21: 223-232

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos por su apoyo y colaboración a mi profesor patrocinante Dr. Ricardo Enríquez.

A la Sra. Mónica Monrás por su ayuda desinteresada y constante disposición para enseñar.

A todos los miembros de la Unidad de Ictiopatología del Instituto de Patología Animal, que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

Y a mi esposo Rodrigo Jofré, por su apoyo, colaboración y comprensión .