



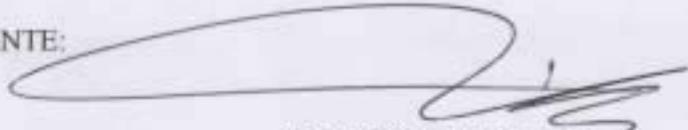
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias**  
**Instituto de Patología Animal**

**Inoculación de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y Salmones del Atlántico (*Salmo salar*) con Homoginizados de Riñón de Salmones del Atlántico enfermos de Leucemia Linfoblástica**

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

**Jorge Enrique Navarro Ibaceta**  
**Valdivia Chile 1999**

PROFESOR PARTROGINANTE:



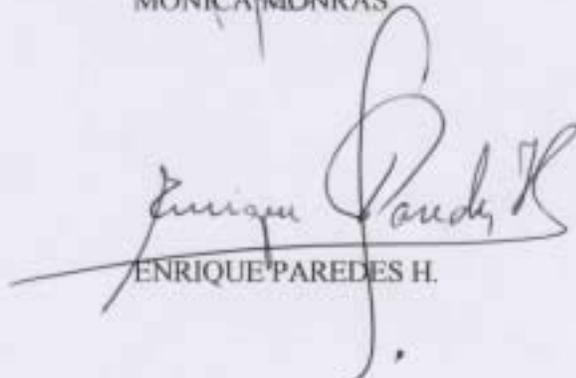
RICARDO ENRIQUEZ S.

COLABORADOR:



MÓNICA MONRAS

PROFESORES CALIFICADORES:



ENRIQUE PAREDES H.



MARCOS MOREIRA E.

**FECHA DE APROBACIÓN:**

**11 DE JUNIO DE 1999**

## INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y METODO	6
5. RESULTADOS	10
6. DISCUSIÓN	24
7. CONCLUSIONES	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31

**"INOCULACIÓN DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) y SALMONES DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) CON HOMOGEGINIZADOS DE RIÑÓN DE SALMONES DEL ATLÁNTICO ENFERMOS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA".**

## **1. RESUMEN**

Antecedentes de una nueva enfermedad diagnosticada como Leucemia Linfoblástica (LL) que se presenta en salmónidos de cultivo en Chile, afectando principalmente a Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) y Salmón del Atlántico (*S. salar*) motivó la realización de inoculaciones en T. Arcoiris y S. Atlántico con homogeinizado crudo y homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m) de peces enfermos con LL, para aportar antecedentes a la etiología de la enfermedad, susceptibilidad de estas especies en cultivo y comparar los cuadros clínicos.

De los peces en estudio se realizaron necropsias, estudios sanguíneos, tinciones de Gram y Giemsa en improntas de órganos y en frotis sanguíneos. También se seleccionaron muestras para estudio histológico y de microscopía electrónica.

Se observó en T. Arcoiris inoculadas con homogeinizado crudo una mortalidad acumulada por (LL) de 42% (8/19) y en las T. Arcoiris inoculadas con homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m) la mortalidad acumulada por LL fue 23.5% (4/17). Los S. Atlántico inoculados con homogeinizado crudo se detectó presencia de LL en el 50% (9/18) y para los que fueron inoculados con homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m) de 41.2% (7/17).

En este ensayo se encontró un (7%) del total de peces positivos a la espora de **Nucleospora salmonis** (*N.s.*). Las T. Arcoiris se detectó *N.s.* a los 54 días PI y en los S. Atlántico a los 103 días PI. *N.s.* no se detectó en los peces inoculados con homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m).

A la microscopía electrónica se observaron partículas homologables a virus (virus-like) en S. Atlántico inoculados con homogeinizado crudo sugiriendo la presencia de un retrovirus por las características de LL.

Histológicamente se diagnosticó LL en riñón de T. Arcoiris inoculadas con homogeinizado crudo, no encontrándose en los otros peces con LL, acompañado de un aumento de células melanomacrofágicas, trastornos degenerativos y congestión difusa indicando que alguna noxa estaría produciendo estas lesiones.

El Volumen Globular Aglomerado (VGA) se pesquisó en 11/28 peces del total con valores  $\leq$  34% que estaría indicando anemia. Con respecto a la capa flogística  $\geq$  2 mm fue detectada en 4/16 de los peces con LL, lo cual indicaría una apreciación indirecta de la leucemia.

De los signos externos encontrados en los peces con LL, destacaron la piel oscura (25%), exoftalmia (14%) y branquias pálidas (21%). A la inspección interna se encontró esplenomegalia (36%), renomegalia (21%), hepatomegalia (14%) todos signos característicos de LL, pero inespecíficos.

Palabras claves: **Leucemia Linfoblástica, T. Arcoiris, S. Atlántico, Inoculación experimental.**

**"DISEASED LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA FISH HOMOGENATES INOCULATED IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) AND ATLANTIC SALMON (*Salmo salar*)."**

**2. SUMMARY**

A new disease diagnosed as Lymphoblastic Leukemia (LL) becomes present in cultured salmonids in Chile, affecting mainly Rainbow Trout (*O. mykiss*) and Atlantic Salmon (*S. salar*) this motivated the realization of intraperitoneal injections in Rainbow Trout and Atlantic Salmon, with an inoculum of crude and filtered (0,22  $\mu$ m) homogenate of fish naturally infected with LL, to contribute and find the etiology of the disease, susceptibility of these species and compare the clinical signs.

Of the fish studied necropsies, blood tests, Gram and Giemsa stains of imprints of organs and blood smears were made. Also samples were selected for the histological study and electron microscopy.

Rainbow Trout inoculated with crude homogenate presented an accumulated mortality by LL of 42% (8/19) and the Rainbow Trout inoculated with filtered (0,22  $\mu$ m) homogenate had an accumulated mortality by LL was 23,5% (4/17). The Atlantic Salmon inoculated with crude homogenate the presence of LL was detected in 50% (9/18) and in the Atlantic Salmon with filtered (0,22  $\mu$ m) homogenate was 41,2% (7/17).

In this experiment a (7%) of the total fish were found positive to the spore of **Nucleospora salmonis** (*N.s.*). *N.s.* was detected in Rainbow Trout 54 days post-injection (PI) and in the Atlantic Salmon 103 days PI. *N.s.* was not detected in the fish inoculated with filtered (0,22  $\mu$ m) homogenate.

Particles comparable to a virus (virus-like) were observed in the electron microscope in Atlantic Salmon inoculated crude homogenate, suggesting the presence of a retrovirus because of the characteristics of LL.

Positive diagnose of LL was found in the histological study in Rainbow Trout inoculated with crude homogenate and now other fish were found positive to LL but there was an increment in melanomacrophagic cells, degenerative lesions and general congestion indicating that some noxa may produce these lesions.

In the haematocrit 11/28 of the total fish had values  $\leq$  (34%) indicating anemia. The flogistic layer  $\geq$  2 mm was detected in 4/16 fish with LL indicating a process of leukemia.

The external signs found in fish with LL were dark skin (25%), exoftalmia (14%) and pale gills (21%). The internal inspection (36%) esplenomegaly, (21%) renomegaly, (14%) hepatomegaly was observed al signs characteristic to LL, but unspecific.

**Key words: Lymphoblastic Leukemia (LL), Rainbow Trout, Atlantic salmon, and experimental inoculation.**

### 3. INTRODUCCION

Chile es considerado el segundo productor mundial de Salmonídeos en confinamiento, alcanzando durante 1996 la cifra récord de 135.278 toneladas cosechadas, siendo el salmón congelado y fresco los productos de mayor importancia comercial de exportación (Méndez 1996; Méndez 1997).

El extraordinario crecimiento de la salmonicultura nacional, que se desarrolla principalmente en la X Región (Alvarado y col., 1990; Carvajal y col., 1990) se debe a las claras ventajas comparativas que posee, tales como: abundante cantidad y calidad de agua, bajos costos de inversión y producción y las oportunidades de llegar con el producto al mercado internacional en épocas de menor competencia comercial (Méndez y Munita, 1989; Alvarado y col., 1990).

La industria nacional ha buscado aumentar su competitividad a través de la reducción de costos, objetivo que involucra mejorar las tasas de conversión de alimento y disminuir las tasas de mortalidad. Es en este último punto donde el efecto de las enfermedades constituye la variable que mayor trastorno puede provocar en los cultivos de Salmonídeos. Al respecto se puede señalar que la histórica ventaja de Chile como poseedor de un ambiente libre de ictiopatologías se ha ido perdiendo paulatinamente (Méndez y Munita, 1989), originado en parte por el alto nivel de importación de ovas que presenta el país (Bravo, 1992; Mardones y Vega, 1993; Méndez y Vidal, 1994), en su mayoría desde países que presentan enfermedades infectocontagiosas y otras de etiología desconocida, las que causan altas mortalidades y grandes pérdidas económicas cuando se establecen en los nuevos ecosistemas (Maquiavello, 1992; Bravo, 1993). Además, la presencia en el medio acuático de otros animales que conviven en el cultivo (peces nativos, aves y mamíferos acuáticos), establece una fuente de contagio y reservorio de agentes infectocontagiosos que deben ser consideradas y estudiadas (Bustos, 1991).

Recientemente, se ha comunicado una enfermedad que provoca mortalidad en salmones de cultivo de la X Región, en diferentes edades y con manifestaciones clínicas inespecíficas como tumefacción renal y exoftalmia. Al estudio histopatológico se diagnosticó como "Leucemia Linfoblástica" (Cubillos y col., 1995), la signología clínica de la enfermedad en Chile, las especies salmonídeas afectadas, además, del impacto de la condición en la salmonicultura nacional han sido estudiadas por Enriquez y col. (1997), Nuñez (1997), Soto (1997), Suarez (1997)

En British Columbia, Canadá, esta enfermedad se ha llamado "**Anemia Marina**" o "**Leucemia Plasmocitoídea**" (LP) que causó severas pérdidas en peces de cultivo. La enfermedad aparentemente de carácter neoplásico-infecciosa (Stephen y col., 1995), fue reconocida a mediados de 1988 en peces de 2 a 4 Kg, los cuales presentaron una mortalidad acumulada de hasta un 50 %, hecho que se repitió en la siguiente temporada con mortalidad de 80% (Kent y Dawe, 1993). Una enfermedad similar ha sido diagnosticada en salmones Chinook (*O. tshawytscha*) en fase de agua dulce en las regiones de Washington y California (USA), donde a partir de octubre y noviembre de 1987 se han producido pérdidas en la producción (Morrison y col., 1990).

Se sospecha que los agentes causantes de la enfermedad son dos, un parásito microsporídeo *Enterocytozoon salmonis* (Chilmonczyk y col., 1991), actualmente denominado *Nucleospora salmonis* y un virus oncogénico (retrovirus) (Hedrick y col., 1991).

Los microsporidios han sido descritos como parásitos intracelulares obligados, los cuales, por su biología y organización conforman el Phylum Microspora. Por sus características ribosomales y ausencia de mitocondrias y peroxi somas, se les ha considerado como organismos primitivos, insertos entre las bacterias (procariontes) y organismos eucarióticos. Estos miden entre 2 y 4 micrones, poseen una pared indivisa de dos láminas (una exospora y una endospora), y en su interior se encuentra el elemento plasmodial, el esporoplasma, que es la forma infectante del parásito (Sprague, 1977). En la observación al microscopio óptico se puede evidenciar un cuerpo esférico eosinofílico en el interior del núcleo de las células huésped (Elston y col., 1987; Hedrick y col., 1990; Hedrick y col., 1991).

Estudios recientes indican la presencia de un agente causal menor a 0.22  $\mu\text{m}$ , lo cual es considerado como una fuerte evidencia que éste es un virus (Kent y Dawe, 1993). Al respecto se señala que el agente causal de la enfermedad sería un nuevo retrovirus denominado **Virus de la Leucemia del Salmón (SLV)** (Eaton y Kent, 1992), además, estudios efectuados en Salmón Chinook (*O. tshawytscha*), indican que la etiología de esta enfermedad se debería, al menos en parte, a SLV (Eaton y col., 1994).

En Canadá los peces afectados por esta enfermedad presentan natación errática y superficial, su aspecto exterior es oscuro y presentan una marcada palidez branquial, cerca de un 20% muestra una severa exoftalmia bilateral, lo cual se debe a una acumulación de tejido tumoral en el espacio periorbital (Kent y col., 1990). Al realizar el examen interno se observa inflamación del bazo, hígado y riñón. Por otra parte, además de páncreas y corazón estos órganos internos presentan hemorragias petequiales. Algunos peces presentan ascitis con fluido claro o sanguinolento y aumento del grosor de las paredes intestinales. Histológicamente los plasmoblastos proliferan en prácticamente todos los tejidos examinados como riñón, hígado, bazo, grasa mesentérica, meninges, corazón, músculo esquelético, piel y ojos (Kent y col., 1991).

Observaciones de campo reportan que la enfermedad se transmite horizontalmente por cohabitación en agua dulce. Sin embargo, a la fecha, no se ha logrado demostrar su transmisión en agua salada. Respecto a la transmisión vertical se cree que la enfermedad se transmite de padres infectados a la progenie vía huevo o espermatozoide, o bien, que el agente estaría estrechamente asociado a la ova (Kent y col., 1993).

La presencia de esta nueva enfermedad en nuestro país, similar a la encontrada en otros países, enfatiza la necesidad de realizar nuevos estudios, para entender mejor su comportamiento y lograr mejores técnicas de diagnóstico, tratamiento y control. Así, esta tesis tiene como objetivo aportar antecedentes a la etiología de esta enfermedad y verificar la susceptibilidad de Trucha Arco Iris (*O. mykiss*) y Salmón del Atlántico (*S. salar*), especies de importancia comercial en nuestro país.

## 4. MATERIAL Y METODO

### 4.1 Material

#### 4.1.1. Material Biológico

Peces Salmón del Atlántico (*S. salar*) sospechosos de Leucemia Linfoblástica (LL) por sus características clínicas externas fueron transportados vivos en estanques de 200 It cada uno con sus propios difusores y oxígeno desde un centro marino ubicado en Challahue (Latitud 42° Oeste y longitud 73° Sur) hasta el laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile (U.A.C.H.).

Se utilizaron 55 peces sanos de Salmón del Atlántico (*S. salar*), 55 peces de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*). El rango de peso de estos peces osciló entre 50 y 60 gramos. Se aclimataron y posteriormente se conformaron los grupos experimentales (Tabla N° 1).

Todos los peces fueron ubicados en acuarios con aireación constante con capacidad de 100 It de agua estuarina recirculante utilizando filtros Fluval 2000 (18 ‰ salinidad, temperatura promedio de 14.5 ° C), que se cambió una vez a la semana.

**Tabla N° 1: Conformación de los grupos experimentales según especie, número de peces y tipo de inoculación.**

Acuario	Especie	Número de peces	Tipo de inoculación (0,1 ml intraperitoneal)
1	<i>S. salar</i>	20	Homogenado filtrado (0.22 $\mu$ m)
2	<i>S. salar</i>	20	Homogenado crudo
3	<i>O. mykiss</i>	20	Homogenado filtrado (0.22 $\mu$ m)
4	<i>O. mykiss</i>	20	Homogenado crudo
Control	<i>S. salar</i>	15	Solución fisiológica
	<i>O. mykiss</i>	15	Solución fisiológica

#### 4.1.2. Material de Laboratorio

Para realizar el estudio se utilizó la implementación del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Austral de Chile, lo cual permitió realizar las necropsias, tinciones Gram y Giemsa, microhematocritos, exámenes bacteriológicos y virológicos, IFAT-SRS, ELISA-BKD. Las muestras para el estudio histopatológico fueron remitidas al Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y las muestras para microscopía electrónica fueron preparadas y examinadas en el Instituto de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

#### 4.2 Método

##### 4.2.1 Obtención del Inóculo de Peces Naturalmente Infectados

Los inóculos se obtuvieron de peces Salmones del Atlántico (*S. salar*) traídos desde Challaue positivos con Leucemia Linfoblástica después de haber sido revisados por distintos métodos de laboratorio y negativos a SRS (IFAT-SRS) y BFCD (ELISA-BKD, Monoclonal). El órgano utilizado fue riñón, por ser el más afectado por esta enfermedad se homogeneizó y se diluyó 1:4 en Minimum Essential Medium (MEM). De esto se obtuvieron dos inóculos: el homogeneizado crudo y otro homogeneizado pasado a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

##### 4.2.2 Inoculación de los Peces Sanos

Una vez conformado los grupos experimentales de los peces que estaban en los acuarios se realizó un control sanitario de estos previo su inoculación. Se realizaron exámenes bacteriológicos, virológicos, histológicos, IFAT-SRS y ELISA-BKD a diez peces de cada especie que se usaron en el ensayo, basado en el Fish Health Blue Book (Amos, 1985), Manual de O.I.E. (International Aquatic Animal Health Code and Diagnostic Manual, 1993; Nordisk Ministerrad, 1992), resultando negativos.

Con estos homogeneizados se procedió a inocular el 10 de junio de 1998 a los cuatro grupos de peces con (0,1 ml intraperitoneal). El quinto grupo (control) se inoculó con solución fisiológica (0,1 ml intraperitoneal). Los distintos grupos de peces se anestesiaron (Grado 1) con MS-222® (40 mg/l, 20-30 segundos) y se inocularon con 0,1 ml intraperitoneal de homogeneizado crudo o filtrado (0.22  $\mu\text{m}$ ), preparado anteriormente y ubicados en sus respectivos acuarios. Todo los peces recibieron una dieta comercial al 2% de su peso corporal /día durante el ensayo.

MS-222® Laboratorio Veterquímica

### **4.2.3 Registro de Mortalidad Diaria y Acumulada**

Todos los días se revisaron los acuarios en la mañana y en la tarde para ver si habían peces muertos o moribundos, luego se anotaron en una hoja de registro los peces que se encontraban en esta condición y se procedía a procesar las muestras.

La duración del ensayo fue de 107 días post-inoculación (PI) para las T. Arcoiris (*O. mykiss*) y 132 días PI. para los S. Atlántico (*S. salar*).

### **4.2.4 Procesamiento de las Muestras**

#### **4.2.4.1 Examen Clínico Externo**

Cada pez inoculado moribundo o muerto, fue pesado, medido y examinado clínicamente mediante inspección directa describiendo macroscópicamente las alteraciones externas de la piel, aletas, ojos y branquias.

#### **4.2.4.2 Examen Clínico Interno**

Una vez concluido el examen externo, se procedió a realizar la necropsia de los peces de acuerdo al Fish Health Blue Book (Amos, 1985) y al Nordic Manual for the Surveillance and Diagnosis of Diseases in Farmed Salmonids (Midtlying y col., 1992). Se desinfectó la superficie externa de los peces con etanol 75 % y luego se procedió hacer una incisión ventral a las aletas pectorales a nivel de la línea medio ventral en sentido caudal hasta llegar al poro anal, la incisión prosigue en sentido dorso craneal hasta llegar al opérculo, luego en sentido ventral hasta alcanzar el inicio del primer corte, con lo cual se retiró la musculatura del flanco izquierdo, dejando los órganos expuestos al observador. Se examinó cada órgano de la cavidad abdominal (hígado, bazo, riñón, intestino, estómago, vejiga natatoria, órganos de la reproducción, vesícula biliar, grasa perivisceral y musculatura), todo esto se registró en la hoja de protocolo.

#### **4.2.4.3 Estudio Sanguíneo**

Mediante punción caudal o corte de cola, se obtuvo sangre para realizar los frotis y microhematocritos. Los frotis fueron teñidos utilizando la tinción de Giemsa y los microhematocritos fueron centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm. Para la lectura de cada tubo se utilizó tablas de referencia, obteniéndose el porcentaje de volumen globular aglomerado (VGA) y el grosor de la capa flogística. Con este método se pudo determinar el

porcentaje del volumen de sangre que está dado por los eritrocitos y una apreciación del número de leucocitos, considerando que el valor dado para animales domésticos es de aprox. 8000 leucocitos/ml (Wittwer y Böhmwald, 1983). Se considera como peces anémicos a los que presentaron un  $VGA \leq 34\%$  (Stoskopf, 1993).

#### **4.2.4.4 Tinciones de Gram y Giemsa**

De los cinco grupos de peces se realizaron frotis sanguíneos fijados 5 minutos en metanol e improntas de tejido renal, hepático, esplénico fijadas al calor. Luego fueron teñidos utilizando las tinciones de Gram y Giemsa siendo observadas al microscopio óptico con objetivo 100x con la finalidad de visualizar esporas Gram positivas intranucleares y células linfoblásticas.

#### **4.2.4.5 Estudio Histopatológico**

De los peces que presentaron signología clínica de Leucemia Linfoblástica (LL), se obtuvieron muestras para estudio histopatológico. Para esto se utilizó tejido hepático, esplénico y renal, los cuales fueron fijados en formalina bufferizada al 10%. Posteriormente se seleccionaron aquellas muestras del pez que presentaban esporas intranucleares, linfoblastos en órganos y 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). Las muestras seleccionadas fueron procesadas y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H/E) y luego fueron estudiadas en laboratorio de Anatomía Patológica de la Universidad Austral de Chile (U.A.CH.).

#### **4.2.4.6 Microscopía Electrónica**

A todos aquellos peces que presentaron signos clínicos y los VGA disminuidos o con capas flogísticas mayores a 1-2 mm se les tomaron muestras de riñón, hígado y bazo. Estas muestras fueron fijadas en glutaraldehído bufferizado al 2.5% y luego se hizo el estudio por personal del Instituto de Histología utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-700H).

## 5. RESULTADOS

A continuación se presenta los resultados para los cuatro grupos de peces que fueron inoculados intraperitonealmente con homogeinizado crudo y homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m)

En el acuario con Truchas Arcoiris (*O. mykiss*) inoculada con homogeinizado crudo de riñón de Salmón del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado de Leucemia Linfoblástica (LL), se observó 1 pez muerto 24 horas post-inoculación de un total de 20 peces producto de la misma técnica y manipulación en la inoculación, que no se considera en el cálculo de las tasas de mortalidad (Tabla N° 2)

En las siguientes tablas (N° 2 y 3) se observan las mortalidades por Leucemia Linfoblástica de Trucha Arcoiris inoculadas con homogeinizado crudo y filtrado (0,22  $\mu$ m).

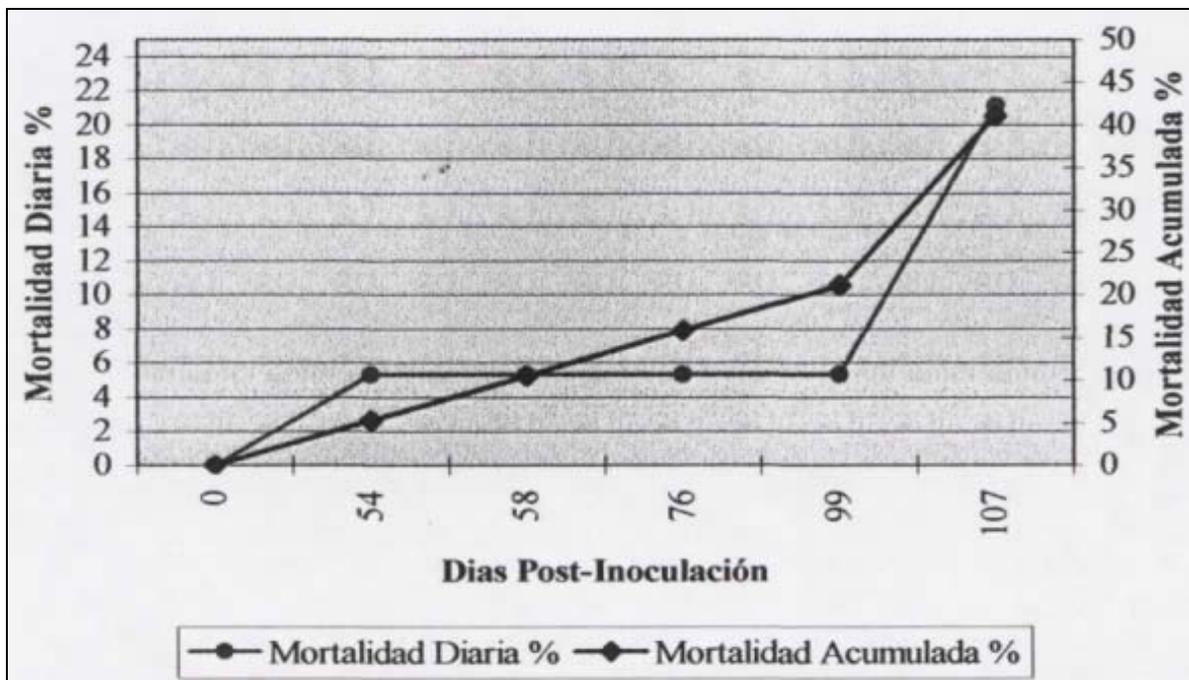
**Tabla N° 2: Tasa de mortalidad diaria y acumulada de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) con Leucemia Linfoblástica (LL) que fueron inoculadas intraperitonealmente con homogeinizado crudo de riñón de Salmón del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado con LL y criados a una temperatura promedio de agua de 14.5° C.**

Fecha	Días Post-Inoc.	N= 19			
		Mortalidad Diaria		Mortalidad Acumulada	
		N°	%	N°	%
10-Jun	0	0	0	0	0
3-Ago	54	1	5,3	1	5,3
7-Ago	58	1	5,3	2	10,5
25-Ago	76	1	5,3	3	15,8
17-Sep	99	1	5,3	4	21,1
25-Sep	107	4	21,1	8	42

En esta tabla se presentan los días post-inoculación en que se encontraron los peces muertos o moribundos con un diagnóstico positivo a LL.

La tasa de mortalidad observada fue de 42%. Se observa que el primer pez moribundo se detectó a los 54 días post-inoculación.

A continuación se gráfica la curva de mortalidad observada en Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) inoculada intraperitonealmente con homogeinizado crudo de riñón de Salmón del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado con LL.



**GRÁFICO N° 1:** Mortalidad diaria y acumulada (%) de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) inoculada intraperitonealmente con homogeinizado crudo de riñón de Salmón del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado con Leucemia Linfoblástica y criados a una temperatura promedio de agua de 14,5 ° C.

En el acuario con Truchas Arcoiris (*O. mykiss*) inoculadas, con homogenizado filtrado (0,22  $\mu$ m) de riñón de Salmón del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado de LL, se observó 3 peces muertos a las 24 horas post-inoculación de un total de 20 peces producto de la misma técnica y manipulación en la inoculación que no se consideran en el cálculo de las tasas de mortalidad (Tabla N° 3).

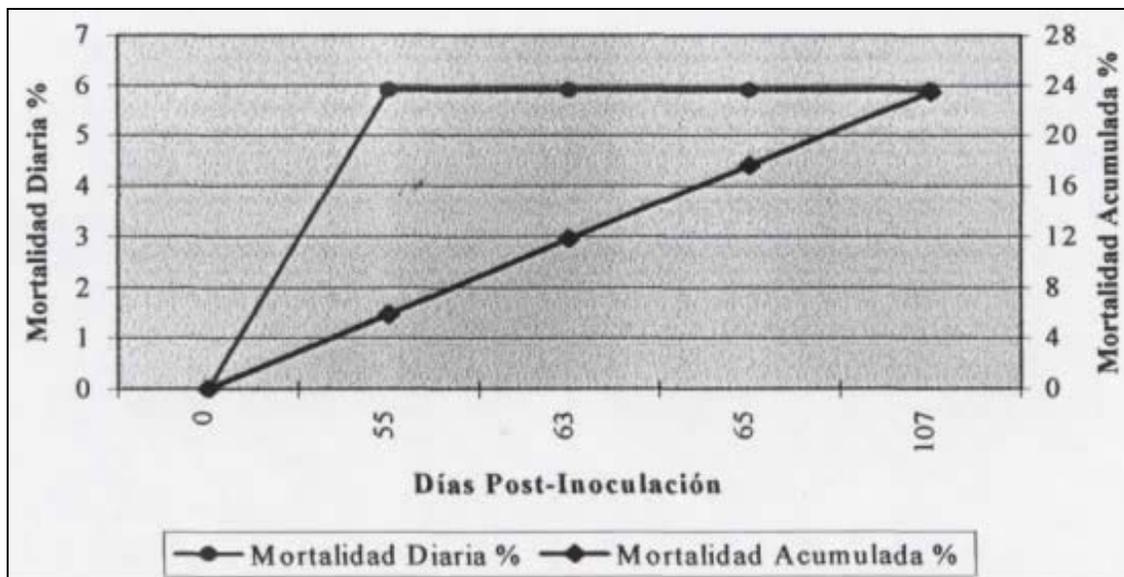
**Tabla N° 3: Tasa de mortalidad diaria y acumulada de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) con Leucemia Linfoblástica (LL) que fueron inoculadas intraperitonealmente con homogenizado filtrado (0,22  $\mu$ m) de riñón de S. Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado con LL criados a una temperatura promedio de agua de 14.5° C.**

Fecha	Días Post-Inoc.	N= 17			
		Mortalidad Diaria		Mortalidad Acumulada	
		N°	%	N°	%
10-Jun	0	0	0	0	0
4-Ago	55	1	5,9	1	5,9
12-Ago	63	1	5,9	2	11,8
14-Ago	65	1	5,9	3	17,6
25-Sep	107	1	5,9	4	23,5

En esta tabla se presentan los días post-inoculación en que se encontraron los peces muertos o moribundos con un diagnóstico positivo a LL.

La tasa de mortalidad observada fue de 23,5 %. Se observa que el primer pez moribundo se detectó a los 55 días post-inoculación.

A continuación se gráfica la curva de mortalidad observada en Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) inoculada intraperitonealmente con homogenizado filtrado (0,22  $\mu$ m) de riñón de Salmón de Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado con LL.



**GRÁFICO N° 2:** Mortalidad diaria y acumulada (%) de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) inoculada intraperitonealmente con homogenizado filtrado (0,22  $\mu$ m) de riñón de Salmón del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado con Leucemia Linfoblástica y criados a una temperatura promedio de agua de 14,5 °C.

A las 24 horas post-inoculación de un total de 20 peces Salmones del Atlántico (*S. salar*) inoculado IP con homogeinizado crudo y filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ) de riñón de Salmón del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectado con LL se observaron 2 y 3 peces muertos producto de la misma técnica y manipulación en la inoculación. Estas mortalidades no se consideran en los cálculos ya que resultaron ser negativos a LL.

En los Salmones del Atlántico (*S. salar*) se tomaron muestras dirigidas de los peces que presentaban natación errática, superficial e inapetencia. Estos fueron sacrificados en los tiempos post-inoculación que se indican y al obtener la muestras correspondientes se encontraron signos de LL en las tinciones de Gram y Giemsa, tanto para los peces inoculados con homogenado crudo y homogenado filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ).

A continuación se presentan los Salmones del Atlántico (*S. salar*) que fueron sacrificados y en los cuales se diagnosticó LL (Tablas N° 4 y 5). Estos fueron inoculados intraperitonealmente con homogeinizado crudo y filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ) de riñón de Salmón Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectados con LL a una temperatura promedio de agua de 14,5 °C.

**Tabla N° 4: Fecha de sacrificio de S. del Atlántico (*S. salar*) encontrados con signos de Leucemia Linfoblástica (LL) que fueron inoculados intraperitonealmente con homogeinizado crudo de riñón de S. del Atlántico (*S. salar*) naturalmente infectados con LL y criados a una temperatura promedio de agua de 14,5°C.**

Fecha	Días Post-Inoc.	N = 18			
		Peces con LL		Mortalidad Acumulada	
		n	%	n	%
10-Jun	0	0	0	0	0
24-Ago	75	1	5,5	1	5,5
21-Sep	103	3	16,6	4	22,2
22-Sep	104	1	5,5	5	27,7
20-Oct	132	4	22,2	9	50

En esta tabla se presenta la fecha de sacrificio y los días post-inoculación en el cual se encontraron peces positivos a LL.

La tasa de mortalidad observada fue de 50%. Se observa que el primer pez moribundo se detectó a los 75 días post-inoculación.

**Tabla N° 5: Fecha de sacrificio de *S. del Atlántico (S. salar)* encontrados con signos de Leucemia Linfoblástica (LL) que fueron inoculados intraperitonealmente con homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m) de riñón de *S. del Atlántico (S. salar)* naturalmente infectados con LL y criados a una temperatura promedio de agua de 14,5°C.**

Fecha	Días Post-Inoc.	N = 17			
		Peces con LL		Mortalidad Acumulada	
		n	%	n	%
<b>10-Jun</b>	0	0	0	0	0
23-Sep	105	1	5,8	1	5,8
24-Sep	106	2	11,7	3	17,6
20-Oct	132	4	23,5	7	41,2

En esta tabla se presenta la fecha de sacrificio y los días post-inoculación en el cual se encontraron peces positivos a LL.

La tasa de mortalidad observada fue de 41,2%. Se observa que el primer pez moribundo se detectó a los 105 días post-inoculación.

### 5.1. Estudio clínico

A continuación se presentan los resultados (Tablas N° 6 y 7). de las lesiones externas y hallazgos internos de los peces inoculados con homogeinizado crudo y homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m).

**Tabla N° 6: Distribución de las lesiones externas observadas en los cuatro grupos de peces inoculados.**

	<i>O. mykiss</i> <i>Homogenado</i> <i>crudo</i>		<i>O. mykiss</i> <i>Filtrado</i> <i>0,22 um</i>		<i>S. salar</i> <i>Homogenad</i> <i>o crudo</i>		<i>S. salar</i> <i>Filtrado</i> <i>0,22 um</i>		Total	
	N= 19		N= 17		N= 18		N= 17		N= 71	
<b>Lesiones Externas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Exoftalmia</b>	5	26	2	12	1	6	0	0	<b>8</b>	<b>11</b>
<b>Branquias pálidas</b>	6	32	3	18	0	0	3	18	<b>12</b>	<b>17</b>
<b>Úlceras cutáneas</b>	3	16	5	29	0	0	0	0	<b>8</b>	<b>11</b>
<b>Piel oscura</b>	16	84	12	71	0	0	0	0	<b>28</b>	<b>39</b>

En este cuadro se aprecia que el 11% del total de los peces presentaron exoftalmia, 17% branquias pálidas, 11% úlceras cutáneas y 39% piel oscura, además, todos los peces presentaron algún grado de descamación.

**Tabla N° 7: Distribución de los hallazgos internos observadas en los cuatro grupos de peces inoculados.**

	<i>O. mykiss</i> <i>Homogenado</i> <i>crudo</i>		<i>O. mykiss</i> <i>Filtrado</i> <i>0,22 um</i>		<i>S. salar</i> <i>Homogenado</i> <i>crudo</i>		<i>S. salar</i> <i>Filtrado</i> <i>0,22 um</i>		Total	
	N= 19		N= 17		N= 18		N= 17		N= 71	
<b>Hallazgos Internos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Hepatomegalia</b>	5	26	4	24	0	0	1	6	<b>10</b>	<b>14</b>
<b>Esplenomegalia</b>	11	58	5	29	6	33	7	41	<b>29</b>	<b>41</b>
<b>Renomegalia</b>	4	21	3	18	3	17	1	6	<b>11</b>	<b>15</b>
<b>Congestión Intestinal</b>	7	37	10	59	0	0	1	6	<b>18</b>	<b>25</b>

Los hallazgos más comunes fueron: esplenomegalia 41%, renomegalia 15%, hepatomegalia 14%, también se apreciaron peces con congestión intestinal 25%.

## 5.2. Tinciones de Gram y Giemsa.

Los resultados y de las tinciones de Gram y Giemsa en frotis de sangre e improntas de órganos, realizados en los cuatro grupos en estudio inoculados IP se presentan en las siguientes tablas.

### 5.2.1. Presencia de esporas de *Nucleospora salmonis*.

**Tabla N° 8: Hallazgos de esporas de *N. salmonis* en improntas de órganos teñidos con Gram y frotis de sangre teñidos con Giemsa según cada grupo en estudio inoculado.**

	<i>O. mykiss</i> Homogenado crudo		<i>O. mykiss</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		<i>S. salar</i> Homogenado crudo		<i>S. salar</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		Total	
Tinción	N = 19		N = 17		N = 18		N = 17		N = 71	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Gram	2	11	0	0	3	17	0	0	5	7
Giemsa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Se encontró un 7% de peces con esporas de *N. salmonis* a la tinción de Gram (Foto N° 1). en riñón y hígado Se destaca que solo se encontró en aquellos que fueron inoculados intraperitonealmente con homogenizado crudo y no los homogenizado filtrados (0,22 $\mu$ /m).

Los primeros en presentar esporas Gram positivas fueron las Truchas Arcoiris (*O. mykiss*) inoculados con homogenizado crudo a las 8 semanas (54 días) post-inoculación (PI) y los Salmones del Atlántico (*S. salar*) inoculados con homogenizado crudo a las 15 semanas (103 días) PI a una temperatura de agua de 14,5° C. No se detectaron esporas en forma circulante a la tinción de Giemsa de frotis sanguíneos en los peces inoculados.



**FOTO N° 1: Tinción de Gram en impronta de riñón de S. Atlántico (*S. salar*) inoculados con homogeinizado crudo mostrando *Nucleospora salmonis* (1280 x).**

### **5.3. Estudio Sanguíneo**

#### **5.3.1. Leucemia y Leucocitosis**

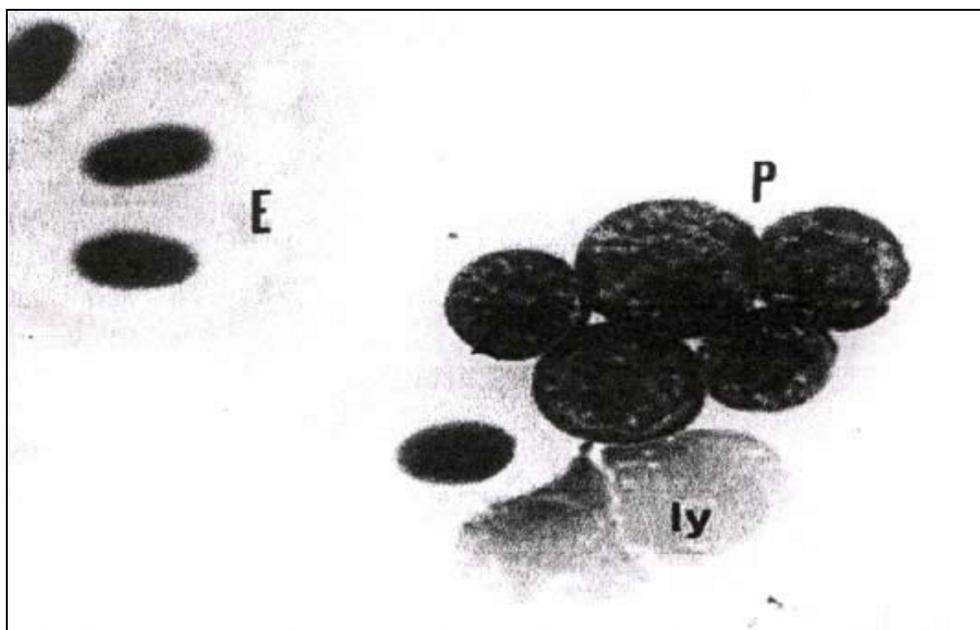
De los peces inoculados con homogeinizado crudo y homogeinizado filtrado se les sacó una muestra de sangre que se visualizó con tinción de Giemsa al microscopio óptico.

En la tabla siguiente se presenta los resultados de los frotis sanguíneos teñidos con Giemsa en los diferentes grupos en estudio.

**Tabla N° 9: Hallazgos de Leucemia Linfoblástica y Leucocitosis en frotis sanguíneos teñidos con Giemsa de acuerdo a cada grupo en estudio.**

	<i>O. mykiss</i> Homogenado crudo		<i>O. mykiss</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		<i>S. salar</i> Homogenado crudo		<i>S. salar</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		Total	
	N=19		N=17		N=18		N=17		N=71	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Leucocitosis</b>	4	21	0	0	4	22	8	47	<b>16</b>	<b>23</b>
<b>Leucemia Linfoblástica</b>	8	42	4	24	9	50	7	41	<b>28</b>	<b>39</b>

El 23% de los peces presentó Leucocitosis y un 39% Leucemia Linfoblástica. Los peces con LL presentaron en frotis sanguíneos células sanguíneas inmaduras (linfoblastos) muy abundantes con núcleo fuertemente teñido y escaso citoplasma (Foto N° 2).



**FOTO N° 2: Tinción de Giemsa en frotis sanguíneo de T. Arcoiris (*O. mykiss*) con una proliferación de Linfoblastos o Plasmoblastos (P), Inclusiones Intranuclear (flecha), Eritrocitos (E), Eritrocitos usados (LY). 1280 x.**

### 5.3.2. Volumen Globular Aglomerado (VGA).

A continuación se presentan los distintos VGA para cada uno de los grupos en estudio en los cuales se encontraron peces muertos positivos a LL.

**Tabla N° 10: Distribución de peces con VGA  $\leq 34\%$  y capa flogística  $\geq 2$  mm.**

	<i>O. mykiss</i> Homogenado crudo	<i>O. mykiss</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m	<i>S. salar</i> Homogenado crudo	<i>S. salar</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m	Total
	N=8	N=4	N=9	N=7	N=28
Hematocrito $\leq$ 34%	3/8	3/4	1/9	4/7	11/28
Capa flog. $\geq$ 2mm	1/8	0	2/9	1/7	4/24

De los 28 peces con LL 11/28 presentaron un hematocrito  $\leq 34\%$  y con una capa flogística  $\geq 2$  mm solo 4/24 de los Salmones del Atlántico (*S. salar*) inoculados.

### 5.4. Asociación de peces con Leucemia Linfoblástica (LL) y sus características externas e internas.

En los peces muertos por LL se encontraron las siguientes lesiones externas y hallazgos internos.

**Tabla N° 11: Asociación de peces con LL y sus características externas.**

	<i>O. mykiss</i> Homogenado crudo		<i>O. mykiss</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		<i>S. salar</i> Homogenado crudo		<i>S. salar</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		Total	
	N=8		N=4		N=9		N=7		N=28	
Lesiones Externas	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Exoftalmia	3	38	1	25	0	0	0	0	4	14
Branquias pálidas	3	38	3	75	0	0	0	0	6	21
Úlceras cutáneas	1	13	1	25	0	0	0	0	2	7
Piel oscura	4	50	3	75	0	0	0	0	7	25

El 25% presentó piel oscura, 21% branquias pálidas, 14% exoftalmia y 7% úlceras cutáneas.

**Tabla N° 12: Asociación de peces con LL y sus características clínicas internas.**

	<i>O. mykiss</i> Homogenado crudo		<i>O. mykiss</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		<i>S. salar</i> Homogenado crudo		<i>S. salar</i> Filtrado 0,22 $\mu$ m		Total	
	N=8		N=4		N=9		N=7		N=28	
Hallazgos Internos	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hepatomegalia	2	25	2	50	0	0	0	0	4	14
Esplenomegalia	4	50	4	100	2	22	0	0	10	36
Renomegalia	4	50	0	0	2	22	0	0	6	21
Congestión Intestinal	2	25	1	25	0	0	0	0	3	11

De la tabla se puede destacar que el 36% presentó esplenomegalia, 21% renomegalia, 14% hepatomegalia, y 11% de congestión intestinal.

### 5.5. Estudio histopatológico.

Basado en los parámetros anteriores se seleccionó un pez de cada grupo con LL para su estudio histológico y se obtuvieron los siguientes resultados.

En la Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) que fue inoculada con homogenizado crudo se encontró una Leucemia Linfoblástica renal caracterizada por una marcada hiperplasia de melanomacrófagos en el intersticio renal, acompañado de numerosas células del tejido hematopoyético con caracteres anaplásicos, estas células evidencian una pérdida de cohesión observándose muy redondas con un citoplasma basófilo, denso y núcleos pleomórficos. Además, se pudo encontrar numerosas células con necrosis y presencia de detritus celular. En los túbulos se puede apreciar variables grados de macrovacualización, signos de necrosis y degeneración hialina en gota. El bazo solo presentó una congestión muy difusa.

En el resto de los grupos en estudio no se presentó un diagnóstico positivo a LL pero, si se presentaron los siguientes hallazgos que pueden deberse a un noxa no específica.

En la Truchas Arcoiris (*O. mykiss*) que fue inoculada con un homogenizado pasado por un filtro (0,22  $\mu$ m), en el riñón se apreció una marcada hiperplasia de melanomacrófagos, acompañada de macrovacualización del citoplasma de las células epiteliales tubulares y en algunos casos con pérdida de integridad tubular y signos de necrosis.

A nivel de hígado en los espacios porta se observó algunos elementos mononucleares acompañados de melanomacrófagos en escasa cantidad. El bazo presentó una hiperplasia leve multifocal de células melanomacrófágicas, además de una marcada congestión difusa.

En el Salmón del Atlántico (*S. salar*) que fue inoculado con homogeinizado crudo el riñón presentó una moderada hiperplasia difusa e intersticial de células melanomacrófágicas. En los epitelios tubulares se apreció una leve tumefacción, en algunos casos vacualización citoplasmática basal, además de abundante proteína intraluminal. A nivel de hígado no se encontró alteraciones histológicas. El bazo se encontró un leve incremento de células melanomacrófágicas, acompañado de un moderado predominio de células reticulares.

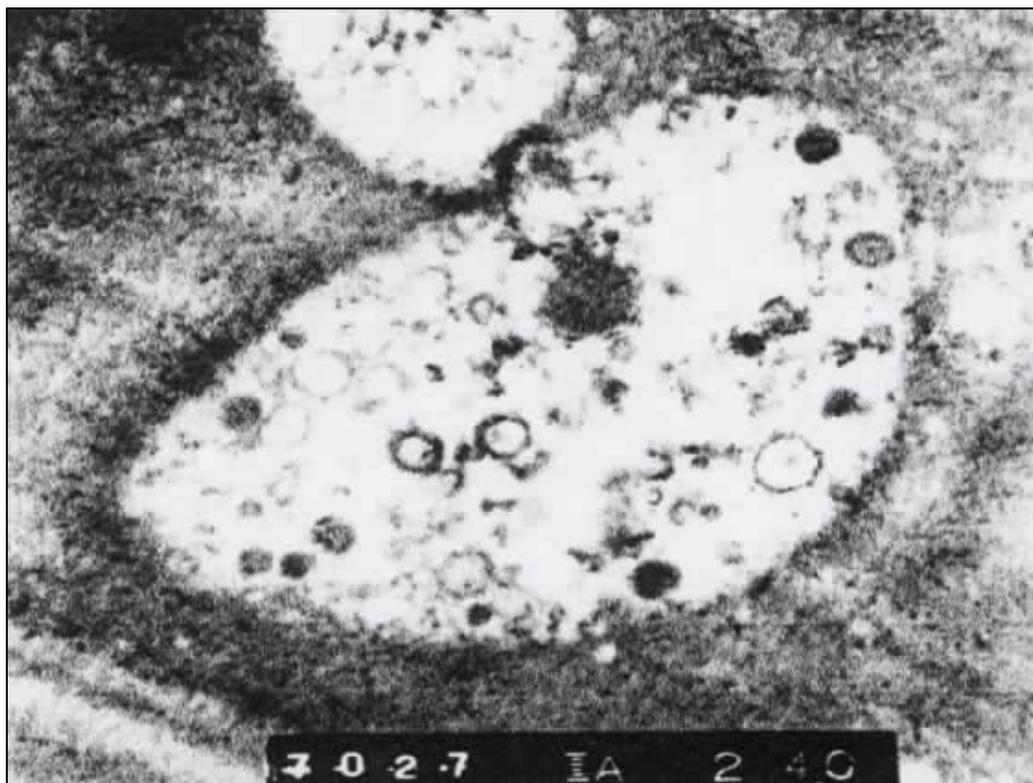
En el Salmón del Atlántico (*S. salar*) que fue inoculado con homogeinizado filtrado (0,22  $\mu$ m) en el riñón se apreció un moderado aumento de células melanomacrófágicas con una leve activación del tejido hematopoyético restante. A nivel de túbulos se presenta moderados trastornos degenerativos (macrovacuolas basales citoplasmáticas), con algunas células que presentan signos de necrosis.

El hígado, a nivel de hepatocitos, presenta citoplasma con moderada macrovacualización de distribución difusa, vacuolas que en algunas células desplaza y comprimen el núcleo. El bazo presentó severa congestión difusa.

### 5.6. Estudio de microscopía electrónica.

Muestras de todos los peces inoculados en el estudio fueron examinados al microscopio electrónico por personal del Instituto de Histología de la Facultad de Medicina U.A.C.H.

Los resultados de microscopía electrónica no son muy contundentes respecto de la presencia viral ya que partículas homologables a virus (virus-like) fueron encontradas en una vacuola citoplasmática en una sola muestra de *S. Atlántico* inoculado con homogeinizado crudo como se muestra a continuación en la siguiente (Foto N° 3).



**FOTO N° 3:** Partículas homologables a virus (virus-like) encontradas dentro de una vacuola citoplasmática en tejido renal de *S. Atlántico* (*S. salar*) inoculado IP con homogeinizado crudo de *S. salar* naturalmente infectado. (24,000 x).

## 6. DISCUSION

El gran desarrollo e intensificación alcanzado en este último tiempo por la salmonicultura nacional, ha conllevado la aparición de nuevas enfermedades como la Leucemia Linfoblástica (LL). Enfermedad de carácter neoplásico que ha ocasionado pérdidas económicas directas e indirectas a la actividad productiva (Enriquez y col., 1997). Así, este trabajo tiene como objetivo principal aportar antecedentes a dilucidar la etiología de esta enfermedad y verificar la susceptibilidad de la Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) y Salmón del Atlántico (*S. salar*), especies de importancia comercial en nuestro país.

Las T. Arcoiris y los S. Atlántico fueron inoculados intraperitonealmente con homogenizado crudo y filtrado (0,22  $\mu$ m) de riñón de S. Atlántico naturalmente infectados con Leucemia Linfoblástica, con lo cual se pudo establecer el carácter infectocontagioso de la enfermedad, ocasionando una mortalidad diaria y acumulada que se analizan a continuación.

En las T. Arcoiris inoculadas con homogenizado crudo se estableció una mortalidad acumulada de 42% (8/19) en un lapso de 107 días. Las primeras mortalidades por LL fueron a los 54 días post-inoculación (PI). Considerando la mortalidad acumulada de T. Arcoiris en el ensayo de Newbound y Kent (1991a), que alcanzó un 19% (5/26) y al compararla con el presente estudio, se puede deducir que estas diferencias se deberían probablemente a las distintas condiciones ambientales, tales como temperatura del agua, tamaño de los acuarios, salinidad, tamaño de los peces y el inóculo, ya que estos autores utilizaron homogenizado de riñón de Salmón Chinook (*O. tshawytscha*).

Cabe destacar que la mortalidad de T. Arcoiris a los 54 días (PI) en que se encontró esporas de microsporidium (*Nucleospora salmonis*) es similar a lo descrito por Hedrick y col. (1991), quienes obtuvieron una mortalidad por este parásito a los 53 días (PI).

Otro aspecto a considerar es que en este ensayo las T. Arcoiris no evidenciaron resistencia a LL, ya que a los 54 días presentaron la enfermedad, distinto de la descripción por Newbound y Kent (1991 a), quienes a los 70 y 112 días (PI) sacrificaron parte de sus T. Arcoiris y no encontraron signos clínicos y anatomopatológicos evidentes de LL, concluyendo que existe una mayor resistencia de esta especie que otros salmonídeos.

En las T. Arcoiris inoculadas con homogenizado filtrado (0,22  $\mu$ m) (Tabla N° 3) se estableció una mortalidad acumulada de 23,5% (4/17) en un lapso de 107 días (PI). La primera mortalidad ocurrió a los 55 días (PI), este tiempo fue mayor a lo encontrado por Kent y Dawe (1993), quienes inocularon filtrado (0,22  $\mu$ m) de S. Chinook en 10 peces S. Chinook presentando la primera mortalidad a los 45 días (PI) con una mortalidad acumulada de 30%

(3/10). Es necesario considerar que no se encontraron antecedentes en la literatura de inoculaciones de *S. Atlántico* a *T. Arcoiris*, siendo estas dos especies diferentes y la infección heteróloga.

Con respecto a los *S. Atlántico* inoculados con homogeinizado crudo de riñón de *S. Atlántico* naturalmente infectados, al no presentar mortalidad pasados 75 días (PI), fueron sacrificados en distintas fechas, encontrándose evidencias de LL a los distintos exámenes practicados a las muestras, lo que nos lleva a concluir que fueron más resistentes a la enfermedad comparado con las *T. Arcoiris* en este ensayo. La presencia de LL acumulada (Tabla N ° 4) para los *S. Atlántico* fue de 50% (9/18) al final del estudio de 132 días (PI). Al ser comparada con lo descrito por Newbound y Kent (1991 a), quienes encontraron una mortalidad acumulada de 9% (2/22) a los 120 días (PI) para esta especie, se puede explicar que esta diferencia se debe a la utilización de homogeinizado crudo de riñón de *S. Chinook* que se describe como la especie de mayor susceptibilidad (Newbound y Kent, 1991 a), lo que supone una mayor concentración del infectante en el homogeinizado, en tanto que para el presente ensayo se inoculó con homogeinizado crudo de *S. Atlántico*, marcando una diferencia en los días que apareció el primer *S. Atlántico* con LL.

Al analizar los datos obtenidos del ensayo de inoculación de *S. Atlántico* con homogeinizado filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ) de *S. Atlántico* naturalmente infectado se encontró una mortalidad acumulada de 41,2% (7/17) (Tabla N ° 5) pasados los 105 días (PI). Si se comparan estos resultados con los de las *T. Arcoiris* inoculadas igualmente con filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ), se puede establecer que en las *T. Arcoiris* la enfermedad se presentó antes que en los *S. Atlántico*. Las *T. Arcoiris* durante todo el ensayo presentaron un nivel mayor de estrés ya que se podían apreciar con natación errática, piel oscura, pudiendo ser más susceptibles a contraer LL por esta condición. En una infección homóloga realizada por Newbound y Kent (1991 b) en *S. Chinook* inoculados con homogeinizado filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ) de *S. Chinook*, encontraron que LL podía ser reproducida mediante esta técnica presentando mortalidades de los 45 días (PI) hasta pasado los 100 días (PI).

Leucemia Linfoblástica no es una enfermedad que cause mortalidades superiores a un 50%, lo que permite deducir que el agente no es altamente patógeno, pero al producir una infección de células sanguíneas de la serie blanca, tiene carácter inmunosupresivo (Kent y Dawe, 1993).

Respecto de la etiología de la LL en este ensayo se encontró un 7% del total de peces positivos a la espora de *Nucleospora salmonis* (*N.s*) (Tabla N ° 8). Este parásito fue observado como intra y/o extra nuclear fuertemente Gram positivo en improntas de hígado, riñón y bazo, con un tamaño aproximado de 2 X 1  $\mu\text{m}$  (Foto N ° 1).

Con el inóculo de homogenizado crudo y a una temperatura de agua de 14,5° C, la aparición de esporas de *N.s.* se hizo aparente en las T. Arcoiris a los 54 días (PI) y luego en los S. Atlántico a los 103 días (PI). Esto es similar a lo descrito por Hedrick y col. (1991), quienes encontraron el parásito a los 53 días (PI) en S. Chinook.

La espora de *N.s.* no fue detectada a la microscopía electrónica en ninguno de los grupos en estudio. Según Dyková y Lom (1980), los parásitos microsporideos comúnmente son encontrados en peces, aunque rara vez están asociados a enfermedades severas, sin embargo, existe una asociación con la presentación de LL concordando con Kent y col. (1990), Hedrick y col. (1991), Kent y Dawe (1993), debido a la infección intranuclear de *N.s.* a células hematopoyéticas con características de linfoblastos en peces con la condición leucémica. Por lo tanto sugiere la hipótesis que *N.s.* actuaría induciendo la estimulación de células linfoblásticas a través de la producción de un factor mitogénico soluble que sería filtrable descrito por Wongtavatchai y col. (1995), lo que explicaría la presencia del parásito en peces sin alcanzar una condición neoplásica y la presentación de LL sin la presencia de agentes virales.

A la tinción de Giemsa en frotis sanguíneos de los peces inoculados, no se detectó la espora de *N.s.* en forma circulante. También se pudo determinar que en las improntas de órganos de peces en los que se utilizó inóculo de homogenizado filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ) no se detectó *N.s.*. Indirectamente se pudo concluir que el tamaño de las esporas o el material infectante del parásito *N.s.* es mayor, reteniéndose en el filtro de (0,22  $\mu\text{m}$ ).

No se puede descartar la hipótesis en que *N.S.* pueda actuar como co-factor en la presentación de la LL ayudando a la replicación de un virus oncogénico (retrovirus) el cual sería la causa primaria de todas las neoplasias infecciosas (Kent y Dawe, 1993), tal como ocurre con el parásito microsporideo *Enterocytozoon bieneusi* en pacientes humanos con SIDA, en donde el parásito está asociado a la infección retroviral (Desportes y col., 1996). Esto podría explicar la presencia simultánea del parásito y de partículas virales en un mismo pez con Leucemia Linfoblástica.

Por otra parte, la observación de partículas homologables a virus (virus-like) de aprox. 100 nm de diámetro a través del microscopio electrónico, sugiere la presencia de un retrovirus que puede ser el agente etiológico de la enfermedad (Foto N° 3). Estos virus poseen características oncogénicas, morfológicamente son circulares con un diámetro de 80-100 nm y una membrana lipoproteica que contiene proyecciones de 8 nm de largo. Los viriones poseen una compleja estructura interna, con una cápside alargada que rodea un RNA proteico con simetría helicoidal cerca de la cubierta externa, que se origina de la célula huésped. También tienen una membrana del core que contiene un núcleo concéntrico o excéntrico. Según la morfología del virión la familia Retroviridae posee partículas A,B,C, y D (Liebermann, 1992).

Estas partículas (virus-like) se encontraron en una muestra de tejido renal en S. Atlántico inoculados con homogenizado crudo, encontrándose negativo el resto de los grupos del ensayo. Esto concuerda con lo descrito por Kent y col. (1990), Newbound y Kent (1991 a), Newbound y col. (1993) respecto de un retrovirus oncogénico *Salmon leukemia virus (SLV)*, señalado como la etiología de LL. Las características de la enfermedad hace pensar en un retrovirus oncogénico, ya que esta enfermedad se asemeja a otras infecciones causadas por otros retrovirus. Al respecto Newbound y Kent (1991 a) asemejan esta enfermedad a la Leucosis Viral Bovina (BLV), Kent y col. (1990) la asocian con la enfermedad que presentan peces de la especie *Ictalurus nebulosus* en la cual se encuentran células blásticas de posible origen viral y Newbound y col. (1993) la comparan con aspectos relacionados a la detección inmunológica de infección retroviral con la infección causada por el virus de la Leucemia Felina (Felv) y BLV. La evidencia de peces con LL, infectados con homogenados de riñón filtrado (0,22  $\mu$ m) sugiere la presencia de un agente viral como *SLV*. Según Eaton y col. (1994) el retrovirus denominado *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 de Leucemia Linfoblástica.

En los frotis sanguíneos teñidos con Giemsa se encontró un 23% de peces con leucocitosis y un 39% con LL (Tabla N° 9). El tipo de célula encontrado es igual al descrito por Soto (1997), estas células se presentan inmaduras con grandes núcleos vesiculados, hendidos y abundante cromatina, además de presentar escaso citoplasma con leve basofilia (Foto N° 2). Esto también fue descrito por Kent y col. (1990), Kent y Dawe (1993), para un tipo de células blásticas que denominan "plasmoblastos". En órganos viscerales como hígado, riñón, y bazo se detectó su presencia la que indica la condición neoplásica de la enfermedad para lo cual se requiere un diagnóstico confirmativo a través de un análisis histológico según Newbound y Kent (1991 b), Newbound y col. (1995) y Stephen y col. (1995).

En el estudio histológico fueron analizados riñones, hígados y bazos de los distintos grupos de peces. Se pesquisó en riñón de T. Arcoiris inoculadas con homogenado crudo una marcada hiperplasia de melanomacrófagos en el intersticio renal, acompañado de numerosas células del tejido hematopoyético con caracteres anaplásicos. En el resto de los órganos en estudio no se diagnosticó LL, pero a nivel de parenquima se detectó un aumento de células melanomacrófágicas, trastornos degenerativos y congestión difusa. Todo esto indicaría que alguna noxa no específica estaría produciendo este daño. Kent y col. (1990) y Suarez (1997), establecen que el riñón es el órgano de elección para el diagnóstico histológico inicial de LL.

El criterio histológico sería 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 (Morrison y col., 1990).

El resultado histológico también puede ser influenciado por el carácter crónico de LL, ya que la infiltración de las células blásticas en los diferentes órganos, es tardía. Esto concuerda con lo descrito para Leucemia Plasmacitoídea por Kent y col. (1990), 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.

En el Volumen Globular Aglomerado (VGA) se pudieron pesquisar 11/28 peces del total con valores  $\leq 34\%$  (Tabla N° 10). En las T. Arcoiris con LL se pudo apreciar que todos los peces con palidez branquial, también evidenciaron valores de VGA de 21-34% indicando que la palidez branquial fue un reflejo de la condición anémica. La presencia de estos signos sugiere la presencia de LL, debido a que son signos característicos de la enfermedad descritos por Hedrick y col. (1990), Morrison y col. (1990) y Newbound y Kent (1991 a).

Esta condición es diferente en los S. Atlántico con LL, ya que se presentaron peces con  $VGA \leq 34\%$  pero sin tener las branquias pálidas, concluyendo que en esta especie y en este ensayo este signo clínico no significa que no tengan un grado de anemia al realizar el VGA.

En los peces de cultivo es importante destacar que la presencia de anemia es una condición que podría atribuirse a otras enfermedades de carácter crónico, como Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS) y la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), entre otros que afectan los órganos hematopoyéticos causando una depresión en la eritrogénesis (Soto, 1997).

Esto también concuerda con Kent y Dawe (1993), quienes en los S. Chinook utilizando un homogeinizado filtrado (0,22  $\mu m$ ) pudieron apreciar que después de 100 días (PI) solo algunos de los peces presentaban palidez branquial con una moderada anemia, no pudiendo confirmar LL solo por este signo. También fue descrito por Flores (1996), quien determinó que a pesar de ser la palidez branquial un signo para determinar anemia, no es un método acertado, observándose que peces sin palidez branquial podían dar hematocritos disminuidos como ocurrió en este ensayo con los S. Atlántico.

La capa flogística  $\geq 2$  mm fue detectada en 4/24 de los peces con LL (Tabla N° 10). Esto estaría indicando una apreciación indirecta del número de leucocitos totales de aproximadamente  $16 \times 10^3$  leucocitos/ml, lo cual correspondería a leucocitosis, ya que el rango de referencia considerado normal para este parámetro corresponde a  $10-12 \times 10^3$  leucocitos/ ml según Stoskopf (1993). Una capa flogística  $\geq 2$  mm es un signo presuntivo de LL (Nuñez, 1997; Soto, 1997) siendo necesaria su evaluación a través de frotis teñidos con Giemsa, en donde se aprecian células blásticas (Enriquez y col., 1997).

De los signos externos de peces con LL (Tabla N° 11) se pudo apreciar que el hallazgo más frecuente a la inspección externa corresponde a piel oscura 25%. Esta condición siendo un signo de LL, no es específico para esta enfermedad, ya que hay otras enfermedades que cursan con este signo como por ejemplo estrés, pero concuerda con lo observado en poblaciones de S. Chinook cultivados en forma intensiva en Canadá y Estados Unidos con "Leucemia Plasmacitoídea" (Kent y col., 1990; Morrison y col., 1990; Newbound y Kent, 1991 a). Cabe destacar que en los S. Atlántico no se presentó esta condición existiendo una diferencia con las T. Arcoiris.

Otro de los signos externos encontrados y característico de LL fue la exoftalmia, con un 14% de peces afectados en este estudio. Este signo también fue descrito por Morrison y col. (1990) y Newbound y Kent (1991 a), quienes lo describen en S. Chinook con LL.

Hay que destacar que en los S. Atlántico inoculados con homogeinizado crudo y filtrado (0,22 *um*) no se presentó este signo, existiendo una diferencia con T. Arcoiris, ya que estas sí presentaron exoftalmia, lo cual estaría indicando que la exoftalmia no siempre se manifiesta estando los peces con LL, hay concordancia con Kent y col. (1990), quienes indican que este signo esta asociado ocasionalmente a la enfermedad.

Los hallazgos macroscópicos más comunes a la inspección interna de los peces con LL fueron: esplenomegalia 36%, renomegalia 21%, hepatomegalia 14% y congestión intestinal con 11% (Tabla N° 12), siendo más frecuentes estas lesiones en la T. Arcoiris que en los S. Atlántico, al igual que lo observado por Suarez (1997) y Soto (1997). Esto concuerda con los hallazgos de peces positivos a LL en los cuales la esplenomegalia y renomegalia son signos característicos de Leucemia Plasmocitoidea (Hedrick y col., 1990; Kent y col, 1990; Morrison y col., 1990; Newbound y Kent, 1991 b; Eaton y Kent, 1992).

## 7. CONCLUSIONES

De los resultados de este estudio es posible concluir que:

- La enfermedad LL puede ser reproducida en T. Arcoiris y S. Atlántico mediante inyección intraperitoneal de homogeinizado de peces naturalmente infectados por LL.
- Las T. Arcoiris fueron más susceptibles a LL que los S. Atlántico.
- LL produce menos del 50% de mortalidad en T. Arcoiris a los 107 días post-inoculación (PI) y en S. Atlántico a los 132 días PI.
- Se detectó la presencia de *Nucleospora salmonis* en T. Arcoiris y S. Atlántico inoculados con homogeinizado crudo y no en los homogeinizados filtrados (0,22  $\mu$ m).
- Los signos clínicos que presentaron los peces enfermos no son específicos.
- La aparición de los signos a LL para T. Arcoiris fue a los 54 días PI y para S. Atlántico a los 75 días PI.
- Se observaron partículas homologables a virus (virus-like) en un riñón de un S. Atlántico inoculados con homogeinizado crudo.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ALVARADO, V., J. SCHAEFER, R. ENRIQUEZ, M. MONRAS.** 1990 Salmonicultura en Chile, estado actual, proyecciones y estados sanitarios. *Medio Ambiente* 11: 9-14.
- 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. 1-14
- BRAVO, S.** 1992. El dilema de las ovas de salmones. *Chile Pesquero*. Diciembre-Enero: 55-59.
- BRAVO, S.** 1993. Screening para ovas importadas. *Chile Pesquero* Julio-Agosto: 35-37.
- BUSTOS, P.** 1991. Aquaveterinaria. *Aquanolicias Internacional*. Diciembre: 29.
- CARVAJAL, J., G. RUIZ y L. GONZALES.** 1990. Histopatología branquial presente en salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Atlántico (*Salmo salar*) en condiciones de cultivo en el Sur de Chile. *Medio Ambiente* II: 53-58.
- CHILMONCZYCK, S., W. T. COX and R. P. HEDRICK** 1991 *Enterodtozoon salmonis* N. sp.: an intranuclear microsporidium from salmonid fish. *J. Protozool.* 38: 264-269.
- CUBILLOS, V., E. PAREDES, R. ENRIQUEZ, A. M. CANAL, M. MONRAS AND A. ALBERDI.** 1995. Histological evidence of Lymphoblastic leukemia in Atlantic Salmon (*Salmo salar*), Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*), and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in south of Chile. Abstract pp. 29 EAFD Seventh International Conference "Disease of fish and shellfish" Palma de Mallorca, 10-15 septiembre 1995.
- DESPORTES, Y., S. CHILMONCZYCK, R. HEDRICK, C. OMBROUCK, D. MONGE, Y. MAIGA and 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.
- DYKOVA, I. and J. LOM.** 1980. Tissue reactions to microsporidian infections in fish. *J. Fish Dis* 3 -.265-283.
- EATON, W. D. and M. L. KENT.** 1992. A retrovirus in chinook salmon (*O. tshawytscha*) with plasmocitoid leukemia and evidence for the etiology of the disease. *Cancer Research* 52: 6496-6500.

- EATON, W., B. FOLKINS, M. KENT.** 1994. Biochemical and histologic evidence of Plasmocytoid Leukemia and Salmon Leukemia Virus (SLV) in wild-caught chinook salmon (*O. tshawytscha*) from British Columbia expressing Plasmocytoid Leukemia *Diseases of Aquatic Organisms* 19: 147-151.
- ELSTON, R. A., M. A. KENT and L. H. HARREL.** 1987. An intranuclear microsporidium associated with acute anemia in the chinook salmon (*O. tshawytscha*). *J. Protozool* 34: 274-277.
- ENRIQUEZ, R., E. PAREDES, V. CUBILLOS, M. MONRAS.** 1997. Determinación de la etiología y estudio de la prevalencia de Leucosis Linfoblástica en Salmonídeos de fase marina. Informe final APTS - INTESAL - Universidad Austral de Chile.
- FLORES, A. M.** 1996. Estudio de las patologías virales intraeritrocitarias en Salmonídeos de cultivo intensivo en el sur de Chile. Tesis, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- HEDRICK, R. P., J. M. GROFF, T. S. Mc DOWELL, M. WILLIS and W. T. COX.** 1990. Hematopoietic intranuclear microsporidian infections with features of leukemia in chinook salmon (*O. tshawytscha*). *Dis. Aquat. Org* 10: 103-108.
- HEDRICK, R. P., J. M. GROFF and D. V. BAXA.** 1991. Experimental infections with *Enterocytosoon salmonis* (Microsporea): Viral or Microsporidian etiology?. *Fish Health Section - American Fisheries Society Newsletter* 19: 1-2.
- KENT, M. L., J. W. GROFF, G. S. TRAXLER, J. G. ZINKL and J. W. BAGSHAW.** 1990. Plasmocytoid leukemia (Marine Anemia): Viral or microsporidian etiology?. *Fish Health Section - American Fisheries Society Newsletter* 19:1-2.
- KENT, M. L., J. W. GROFF, G. S. TRAXLER, J. W. BAGSHAW, S. C. DAWE, J. R. ROOME, W. E. EATON and D. SPEARE.** 1991. Plasmocytoid leukemia (Marine Anemia): Viral or microsporidian etiology?. *Fish Health Section - American Fisheries Society Newsletter*. 19:1-2.
- KENT, M. L., G. C. NEWBOUND, G. S. TRAXLER, C. STEPHEN, S. C. DAWE, D. KEISER., ROOME, W. E. EATON and DR F. MARKHAM.** 1993. Observations on the transmission and range of Plasmocytoid leukemia of chinook salmon. *Fish Health Section - American Fisheries Society Newsletter* 21:1-3.
- KENT, M. L. and S. C. DAWE.** 1993. Further evidence for a viral etiology in plasmocytoid leukemia of chinook salmon (*O. tshawytscha*) *Dis. Aquat. Org* 15: 115-121.

- LIEBERMAN, H.** 1992. Lehrbuch der Veterinärmedizinischen Virologie. G. Fischer. Stuttgart pp. 34-50.
- MACCHIAVELO, M.** 1992. Control de enfermedades virales en Chile. *Chile Pesquero*. Junio-Julio: 39-42.
- MARDONES, A. y R. VEGA.** 1993. Ovas, alevines y smolt: Las necesidades de Chile *Aquanoticias Internacional* Julio-Septiembre: 6-15
- MENDEZ, R. y C. MUNITA.** 1989. La salmonicultura en Chile, de. Ricardo Cortés, Santiago. Pp. 229.
- MENDEZ, R. y L. VIDAL.** 1994. La salmonicultura chilena en 1993. *Aquanoticias Internacional* Enero-Marzo. 24: 39.
- MENDEZ, R.** 1996. En la temporada 1995: Cultivos sobrepasan los US\$ 500 millones. *Aquanoticias Internacional* 28: 7-17.
- MENDEZ, R.** 1997. La acuicultura a tres lustros de su partida. *Aquanoticias Internacional* 35: 21-33.
- MIDTLYNG, P., S. HELGESON, E. JANSSON, A. MORTENSEN y E. RIMÄLÄPÄRNANEN.** 1992. Nordic manual for surveillance and diagnosis of diseases in farmed salmonids. Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter, Copenhagen. pp. 65.
- MORRISON, J., E. MACCONELL; P. CHAPMAN, R. WESTGARD.** 1990. Microsporidium-induced lymphoblastosis in chinook salmon (*O. tshawytscha*) in freshwater. *Diseases of Aquatic Organisms* 8: 99-104.
- NEWBOUND, G. C. y M. L. KENT.** 1991 a. Experimental interspecies transmission of plamacytoid leukemia in salmonid fishes. *Dis. Aquat. Org.* 10: 159-166.
- NEWBOUND, G. C. y M. L. KENT.** 1991 b. Prevalence of plamacytoid 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, JM. SHEPARD, G. M. WRIGHT y M. L. KENT.** 1993. Production of monoclonal antibodies specific for antigens derived from tissue of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *American Journal of Veterinary Reaserch* 54:1426-1431.

- NEWBOUND, G. C., R. J. MARKHAM, M. L. KENT, D. J. SPEARE y M. A. THORBURN.** 1995. Comparative analysis of monoclonal antibody- based immunofluorescence test for plasmacytoid leukemia in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Dis. Aquat. Org.* 21: 123-130.
- NUÑEZ, J. P.** 1997. Estudio de la Leucemia Linfoblástica y su asociación con otras enfermedades en Salmonídeos de cultivo intensivo en fase marina del sur de Chile. Tesis, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- SOTO, M. A.** 1997. Presencia de Leucemia Linfoblástica en salmonídeos de cultivo en la décima región de Chile. Tesis, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- SPRAGUE, V.** 1977. Classification and phylogeny of the Microsporidia. In: Bulla L. A. Jr. and Cheng T. C. (Eds.), *Comparative pathobiology*, Vol. 2, Systematics of the microsporidia. Plenum Press, New York, 510 pp.
- STEPHEN, C., C. RIBBLE, M. KENT.** 1995. Observer Variation in the Histological Diagnosis of Plasmocytoid Leukemia (Marine Anemia). *Canadian Journal Veterinary Research* 59: 15-19.
- STOSKOPF, M. K.** 1993. *Fish Medicine*. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 882.
- SUAREZ, D. A.** 1997. Caracterización clínica y patológica de Leucemia Linfoblástica en salmones y truchas de cultivo. Tesis, M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- WITTWER, F. y H. BÖHMWALD.** 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., P. A. CONRAD y R. P. HEDRICK** 1995 In vitro characteristic of the microsporidian: *Enterocytozoon salmonis*. *J. Euk. Microbiol.* 42: 401-405.