



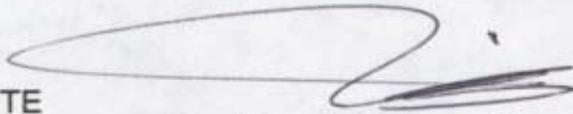
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Patología Animal
Ictiopatología

**Estudio de la presencia del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa
(IPNV) en reproductores salmonideos**

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

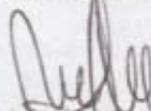
Sorka Andrea Cerna Vera
Valdivia Chile 2000

PROFESOR PATROCINANTE



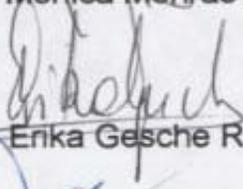
Dr. Ricardo Enriquez S.

COLABORADOR

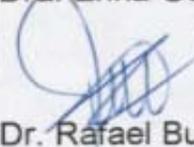


Sra. Mónica Monrás S.

PROFESORES CALIFICADORES



Dra. Erika Gesche R.



Dr. Rafael Burgos A.

FECHA DE APROBACION

30 de Marzo del 2000.

A mis padres y Vania

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	SUMMARY.....	2
3.	INTRODUCCION.....	3
4.	MATERIAL Y METODO.....	9
5.	RESULTADOS.....	15
6.	DISCUSION.....	20
7.	CONCLUSIONES.....	24
8.	BIBLIOGRAFIA.....	25
9.	ANEXOS.....	29
	AGRADECIMIENTOS.....	30

1. RESUMEN

" Estudio de la presencia del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en Reproductores Salmonídeos "

Antecedentes de la presencia de la enfermedad viral Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmónidos de cultivo en Chile, afectando principalmente a salmón del atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), motivó la realización del presente estudio que busca aportar antecedentes sobre la frecuencia de presentación del virus IPN en reproductores salmonídeos.

Un total de 4.612 muestras de riñon-bazo y 72 de suero sanguíneo pertenecientes a reproductores de salmón del atlántico, salmón coho y trucha arcoiris de empresas salmoneras de la Décima y Undécima regiones, fueron analizadas durante el periodo reproductivo de Abril- Junio de 1999. Para ello se aplicaron las técnicas de cultivo celular, RT - PCR y seroneutralización (método beta).

De un total de 4.245 muestras analizadas mediante cultivo celular, 62 (1,46%) fueron identificadas como positivas a IPNV. Estas se confirmaron por RT - PCR para IPNV. De las muestras positivas, 54 (1,27%) correspondieron a salmón coho, 6 (0,14%) a salmón del atlántico y 2 (0,05%) de trucha arcoiris. Adicionalmente aplicando sólo RT - PCR en el estudio de 367 muestras se observó que sólo el salmón del atlántico presentó resultados positivos a IPNV: 2,45%, lo cual dentro de su especie correspondió a un 3,93%. En el caso de ambas técnicas se evidenció que los machos aparecen con un porcentaje mayor de positividad a IPNV. Asimismo de las 72 muestras de suero sanguíneo analizadas por seroneutralización (método beta) sólo se detectó anticuerpos neutralizantes del virus IPN en la especie trucha arcoiris (2,78%). Las muestras de salmón coho retomante, en ninguno de los casos, evidenció resultados positivos a IPNV.

Palabras clave: IPNV, reproductores, salmonídeos.

2. SUMMARY

" Study of the presence of the infectious Pancreatic Necrosis virus (IPNV) in Broodstock of Salmon Fish "

Previous data concerning the presence of the viral disease known as Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in the Chilean salmon aquaculture, which is affecting mainly atlantic salmon (*Salmo salar*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) y coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), was the motivation to carry out the present study which goal is to give more data about the frequency of the presence of IPN virus in salmon broodstock.

A total number of 4.612 samples of kidney-spleen and 72 samples of serum from broodstock of atlantic salmon, coho salmon y rainbow trout from fish farms located in the 10th and 11th region of the country, were analyzed during the reproductive period of April-June 1999. Tissue culture, RT - PCR and seroneutralization were used.

Using tissue culture technique only 62 (1,46%) out of 4.245 samples were positive to IPNV. Positive samples were confirmed by RT - PCR for IPNV. From the total number of positive samples, 54 of them were obtained from coho salmon (1,27%), 6 to atlantic salmon (0,14%) and 2 to rainbow trout (0,05%). Moreover, the use of RT - PCR in 367 samples showed that only atlantic salmon gave positive results to IPNV: 2,45, which within its species corresponds to 3,93%. Both techniques showed however that male have a higher percentage of positive results. From the 72 serum samples analyzed by beta seroneutralization only rainbow trout showed neutralising antibodies of IPNV (2,78%) while returning coho salmon showed no positive results.

Key Words: IPNV, broodstock, salmon.

3. INTRODUCCION

La industria salmonera se inició a principios de la década de los '80 y ha mostrado el mayor dinamismo y crecimiento dentro del sector de la acuicultura. El cultivo de salmones que hace no más de diez años producía aproximadamente 8.600 toneladas, alcanzó durante 1997 las 248.000 toneladas de producción bruta. Esto permitió un crecimiento de un 19,4% en el volumen de las exportaciones de salmónidos respecto a 1996 y de un 25% en valor exportado (Méndez, 1999).

La salmonicultura basa su actividad en el cultivo de cinco especies. De éstas, cuatro son salmones del Pacífico: salmón Coho o Plateado (*Oncorhynchus kisutch*), salmón Rey (*Oncorhynchus tshawytscha*), salmón Cereza (*Oncorhynchus masou*) y la trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), junto al salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Durante la temporada de 1997 el salmón del Atlántico aportó el mayor porcentaje, equivalente al 39% del total de la producción; el salmón Coho alcanzó al 30%, mientras que la trucha Arcoiris aportó un 31,1% (Méndez, 1999).

La intensificación a que se ha llegado con el proceso de producción, así como la alta concentración de la salmonicultura en la Décima Región, y el abastecimiento permanente de ovas provenientes de Europa y Norte América, llevan a que exista permanentemente el riesgo de introducción y diseminación de enfermedades infecto-contagiosas (Reyes, 1983 y 1985; Méndez, 1988; Bustos, 1993). Dentro de éstas, las enfermedades virales son consideradas de mayor importancia, debido a la dificultad del diagnóstico y control, ya que la mayoría de las epizootias son agudas o subagudas y, además, la inexistencia de un tratamiento quimioterapéutico para ellas (Post, 1983; 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 mortalidades en peces adultos, puesto que la inversión que supone el cuidado y el alimento aumenta con el tiempo (de Kinkelin y col., 1991). Un ejemplo claro de esto, se observa actualmente en Noruega, donde la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es considerada la enfermedad infecciosa de mayor importancia económica en el cultivo de salmónidos. Las pérdidas calculadas en 1995 por causa de esta enfermedad llegaron a los US\$ 60 millones y han sido todavía mayores para 1998. Estas se estiman a partir de las mortalidades registradas, pérdidas por la reducción del volumen en la cosecha y los costos de manejo en el caso de la presencia de brotes (Bustos y col., 1999). A pesar de esto, muchos piscicultores consideran a la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), 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 considerada poco importante en otro tiempo, se vuelva intolerable (de Kinkelin y col., 1991).

En nuestro país, el virus IPN (IPNV) fue aislado por primera vez en 1983, desde un stock de trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), los que nunca manifestaron signos de la enfermedad (McAllister y Reyes, 1984). Esto constituye el primer reporte del virus en Sud América, sugiriendo las evidencias que el virus IPN fue introducido con ovas importadas desde Norte América (McAllister y Reyes, 1984). Recientemente se ha logrado la serotipificación de cinco aislados del virus IPN a partir de muestras obtenidas de diferentes puntos geográficos de la Décima ' Región. Estas corresponden al virus IPN serotipo Sp, de origen europeo (Aquanoticias, 1999), aparentemente diseminado en los principales lagos de la Décima Región, donde se produce sobre el 80% de los smolts de la industria nacional (Bravo, 1999). Cabe destacar que todos los otros aislados realizados en Chile, correspondieron al serotipo VR 299, de origen americano (Aquanoticias, 1999).

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 bisegmentada (Roberts, 1989). Poseen una cápside simple formada de 92 capsómeros y su diámetro varía entre 55 a 75 nm (Wolf, 1988). En 1984, en la Reunión del Comité Internacional de Taxonomía de Virus, quedó establecida definitivamente la familia Bimaviridae (Brown, 1986), la cual comprende tres géneros : Aquabirnavirus con la cepa tipo IPNV de peces y moluscos, Avibirnavirus que incluye el virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV), y Entomobirnavirus (DXV) que agrupa a los birnavirus aislados de insectos (Murphy, 1995).

En su última revisión, Hill y Way (1995) propusieron una nueva nomenclatura para denominar a los serogrupos y serotipos de IPNV, pasando a denominarse serogrupos A y B, de tal manera que el serogrupo A estaría constituido por los serotipos A₁ a A₉, y el serogrupo B constituido por un solo serotipo; el B₁ (Tabla N°1).

Tabla N° 1

Clasificación serológica de IPNV.

Nomenclatura actual	Especie	Autor	Origen	Stp*
Serogrupo A				
WB	<i>O. mykiss</i>	Lientzy col., 1973	USA	A ₁
Sp	<i>O. mykiss</i>	Jorgensen y col., 1969	Europa	A ₂
Ab	<i>O. mykiss</i>	Jorgensen y col., 1971	Europa	A ₃
He	<i>Esox lucius</i>	Ahne, 1978	Europa	A ₄
Te	<i>Tollina tenuis</i>	Hill, 1976	Europa	A ₅
C1	<i>Salmo salar</i>	MacDonald, 1983	Canadá	A ₆
C2	<i>O. mykiss</i>	MacDonald, 1983	Canadá	A ₇
C3	<i>Salmo trutta</i>	MacDonald, 1983	Canadá	A ₈
Jasper	<i>O. mykiss</i>	Yamamoto, 1974	Canadá	A ₉
Serogrupo B				
TV-1	<i>Tellina tenuis</i>	Underwood, 1977	Europa	B ₁

* Serotipos según Hill y Way, 1995.

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es una enfermedad aguda altamente contagiosa que afecta a alevines y peces pequeños. Tiene una amplia distribución y comúnmente causa mortalidad inversamente proporcional a la edad del pez, siendo alta en peces jóvenes y muy escasa en peces adultos (en los cuales las infecciones son frecuentemente inaparentes) (Wolf, 1988). Generalmente resultan afectados primero los alevines y juveniles más grandes y de aspecto saludable (Hill, 1982). Fue descrita originalmente en Canadá, en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en 1940 y, 20 años más tarde en truchas (*S. fontinalis* y *O. mykiss*) en Estados Unidos (Roberts, 1989).

Los signos clínicos de la enfermedad IPN pueden variar dependiendo de la cepa del virus, edad y condición fisiológica del huésped (Rosenlund, 1977), así como también de acuerdo a las condiciones ambientales presentes tales como temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad del cultivo (Roberts, 1989).

En los salmónidos, el cuadro agudo de esta enfermedad ocurre entre el primer y cuarto mes de edad, llevando muchas veces a una mortalidad acumulada cercana al 100%. Por el contrario, en peces de 6 meses o más, la infección es subclínica o inaparente, no experimentándose pérdidas significativas. Los brotes de la enfermedad en peces adultos conllevan a portadores del virus, los cuales son usualmente estrés activados (Stoskopf, 1992). Además, en estos mismos peces el páncreas y tejidos vecinos han sido seriamente afectados con la subsecuente restricción en la producción de enzimas pancreáticas lo que se puede traducir en un deterioro del crecimiento y la conversión (Quaglio, 1989).

Externamente los peces afectados por IPN muestran natación errática, con violentos movimientos rotatorios. Aparecen con una pigmentación oscura, una moderada exoftalmia y distensión abdominal y algunas veces presentan hemorragias en el área ventral, incluyendo las aletas ventrales. Las branquias están pálidas (Wolf, 1988).

Al examen post mortem, el hígado y el bazo aparecen pálidos, y el estómago e intestino con ausencia de alimento pero con fluido mucoide. Hemorragias petequiales son evidentes en los ciegos pilóricos y tejido pancreático. Las células acinares pancreáticas, y ocasionalmente la cubierta lipídica muestran una necrosis masiva caracterizada por picnosis, cariorrexis, e inclusiones intracitoplasmáticas (Stoskopf, 1992). La vesícula biliar puede estar dilatada y repleta de bilis (Quaglio, 1989). El epitelio intestinal necrótico se une con el exceso de mucus para formar un exudado catarral blanquecino (McKnighth y Roberts, 1976). Cambios histopatológicos también pueden ocurrir en el tejido renal excretor y hematopoyético. Hay congestión o hemorragia en los glomérulos, edema, y destrucción o descamación del epitelio tubular (Wolf, 1988). El tejido pancreático y hepático están infiltrados por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. El microscopio electrónico revela la presencia de partículas virales citoplasmáticas en el tejido pancreático, hepático, renal y esplénico (Stoskopf, 1992). 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 1.400 grados-día (Calderón, 1998).

Un signo importante de esta virosis es que todas las especies de salmón y trucha comienzan a perder susceptibilidad con la edad. Truchas de alrededor de 6 meses de edad, por ejemplo, son usualmente resistentes a infecciones del virus en forma natural o experimental (Post, 1983). Sin embargo, se han comunicado brotes de IPN en salmones mayores de 5 meses, tanto en agua dulce como salada. Estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo para los smolts de salmón del Atlántico (*S. salar*) de desarrollar IPN en agua marina es 2:9 veces mayor cuando los grupos de smolts de diferente origen son mezclados (Jarp y col., 1994). También se señalan como factores que afectan la aparición de brotes de IPN en agua marina al estrés causado por el transporte cuando los smolts son transferidos al mar y el uso de nuevas concesiones marinas y lugares geográficos (Stangeland y col., 1996). Por otro lado, un elemento importante de considerar 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). Mortalidades extremadamente altas han sido observadas durante epizootias de IPN en alevines de trucha Arcoiris mantenidos con una temperatura del agua entre 10°C y 15,5°C (Post, 1983).

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 (Calderón, 1998). Sin embargo, el peligro radica en que peces de otras especies infectados subclínicamente pueden ser una fuente de IPNV (Wolf, 1988). Por ejemplo, las anguillas (*Anguilla anguilla*) pueden albergar el virus IPN perfectamente patógeno para el alevín de trucha Arcoiris (Castric y Chastel, 1980 ; de Kinkelin y col., 1991). De manera similar este virus puede ser transportado y excretado por aves y mamíferos ictiófagos. Sin embargo, tal diseminación por homeotermos no se ha demostrado aún que tenga resultados en brotes naturales de IPN (Wolf, 1988).

El virus de la Necrosis Pancreática infecciosa también puede ser transmitido verticalmente, a través de las ovas. Ensayos experimentales han demostrado que el virus puede adherirse estrechamente a la superficie de la ova y persistir en ella hasta la eclosión (Ahne y Negele, 1985). Además, puede adherirse al espermatozoide y penetrar a la ova durante la fecundación. Es así como una exitosa transmisión fue lograda con semen incubado con partículas virales antes de la inseminación (Dorson y Torchy, 1985; Bootland y col., 1991). Sin embargo, la mejor evidencia de este tipo de transmisión fue obtenida por Bullock y col. (1976) cuando reportaron que en 2 diferentes laboratorios la enfermedad se presentó en la progenie de peces portadores, aun cuando las ovas habían sido desinfectadas con un yodóforo viricida.

El diagnóstico presuntivo puede basarse en los signos de la enfermedad, histopatología de los tejidos e historia de la patología en la población de peces (Post, 1983). Sin embargo, para confirmar el diagnóstico se requiere del aislamiento del virus en cultivo celular y su identificación se basa en reactividad serológica a través de neutralización, anticuerpos fluorescentes, reacción de inmunoperoxidasa, fijación de complemento, inmunoelectroforesis, coaglutinación, o enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) (Stoskopf, 1992). Este procedimiento de confirmación diagnóstica es el que más éxito ha tenido en Noruega, Escocia y Chile, pero existen otras opciones que se están desarrollando basadas en biología molecular (PCR) y Dot-Blot (Bustos y col., 1999). Los órganos de elección para muestreo virológico en peces portadores son riñón, páncreas, bazo e hígado, en orden de prioridad. El fluido ovárico y seminal puede utilizarse en aquellos ejemplares no sacrificados (McAllister y col., 1987). Para el trabajo de detección del virus, donde la sensibilidad es un requerimiento importante, los homogenizados de tejidos deben ser diluidos al menos 1:10 para reducir su toxicidad (Wolf, 1988).

El virus IPN es replicado en una variedad de líneas celulares de peces salmónidos y no salmónidos. Títulos superiores a 10^8 TCID₅₀ / ml son obtenidos desde líneas celulares tales como, CHSE-214, BF-2 y RTG-2, las cuales son las más sensibles. Las células FHM no son usadas rutinariamente (Roberts, 1989). El virus IPN produce un CPE (efecto citopático celular) lítico en los cultivos celulares. Sin embargo, las líneas celulares pueden estar afectadas persistentemente y no mostrar CPE (Wolf, 1988). El efecto citopático de IPNV se caracteriza por picnosis nuclear y un proceso de encogimiento celular de pequeñas placas visibles a las 24 horas post infección para llegar a una destrucción celular total a los 2 a 3 días post infección para el serotipo Sp (Roberts, 1989).

La temperatura de incubación para el aislamiento de este virus no es crítica y puede realizarse en un rango de temperatura de 4 a 26° C. Es así como una temperatura de incubación de 15°C es comúnmente usada para el aislamiento del IPNV, donde el CPE usualmente aparece dentro de 48 horas. Bajo condiciones favorables de cultivo, el CPE raramente aparece después de 5 días. En su ausencia, sin embargo, un siguiente pasaje debiera ser realizado (Wolf, 1988).

En los últimos años una serie de investigaciones se han llevado a cabo con el fin de encontrar nuevas formas de prevención para IPN (Bustos y col., 1999). Como esta enfermedad afecta principalmente a los cultivos de peces en agua dulce, lo más efectivo y económico de realizar es la prevención. Es así como las medidas de control están dirigidas hacia la utilización de aguas superficiales independientes para el cultivo de ovas y de alevines. Stocks de ovas y peces libres del patógeno específico también pueden ser seleccionados (Wolf, 1988). En la fase de cultivo en agua de mar, las medidas zoonitarias abarcarían la reducción del factor estrés antes y durante la transferencia al mar como también evitar la transferencia de smolts de diferentes procedencias a una misma localidad (Bustos y col., 1999).

Por último, es importante señalar que a partir del mes de Octubre del año 1998, se viene desarrollando en nuestro país una epidemia de IPN que abarca desde la región Metropolitana hasta la Décima Región, comprometiendo a todas las especies salmonídeas cultivadas (Enríquez, 1999. Comunicación personal)*. Debido a esto y basándonos en lo señalado anteriormente es que a través de este estudio se pretende determinar la frecuencia de presentación del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en reproductores salmonídeos, mediante las técnicas de cultivo celular, RT - PCR y seroneutralización (método beta).

* Dr. Ricardo Enríquez S.
Inst Patología Animal
Universidad Austral de Chile

4. MATERIAL Y METODO

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico

4.1.1.1. Células

Se utilizó la línea celular CHSE-214 originada de embrión de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). La temperatura usada para la mantención y multiplicación de las células fue de 20°C y para la inoculación viral 15°C. La línea celular CHSE-214 crece en una monocapa celular con medio de cultivo MEM (Minimum Essential Medium), al cual se le adiciona suero fetal bovino en un 10% en el caso de cultivo celular y un 2% cuando se trata de inoculaciones virales. Además se adicionaron antibióticos para limitar infecciones bacterianas, usando penicilina y estreptomicina en concentraciones de 100 UI / ml y 100 µg / ml de medio, respectivamente.

4.1.1.2. Virus

En este estudio se utilizó un aislado nacional de salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) del virus IPN, mantenido en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.1.1.3. Muestras de reproductores salmonídeos

Se utilizaron 4.612 muestras de riñon-bazo y 72 de suero sanguíneo pertenecientes a reproductores de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), las cuales llegaron al Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile durante el período reproductivo de Abril-Junio de 1999, provenientes de empresas salmoneras ubicadas en la Décima y Undécima regiones de nuestro país.

La distribución mensual y porcentual de estas muestras según técnica diagnóstica, especie y sexo se presentan en las tablas N° 2, N° 3, N° 4 y N° 5.

Tabla N° 2

Distribución porcentual de las muestras de riñon-bazo de reproductores salmonídeos analizadas por cultivo celular en CHSE-214 y confirmadas por RT - PCR según especie y sexo, Abril de 1999.

ESPECIES MUESTRADAS	SEXO				TOTAL
	HEMBRA		MACHO		
	n	%	n	%	
S. del atlántico	83	87,37	12	12,63	95

Tabla N° 3

Distribución porcentual de las muestras de riñon-bazo de reproductores salmonídeos analizadas por RT - PCR, y por cultivo celular en CHSE-214 y confirmadas por RT - PCR según especie y sexo, Mayo de 1999.

ESPECIES MUESTRADAS	SEXO				TOTAL
	HEMBRA		MACHO		
	n	%	n	%	
S. del atlántico	821	70,23	348	29,77	1.169
S. coho	590	71,43	236	28,57	826

Tabla N° 4

Distribución porcentual de las muestras de riñon-bazo de reproductores salmonídeos analizadas por RT - PCR, y por cultivo celular en CHSE-214 y confirmadas por RT - PCR según especie y sexo, Junio de 1999.

ESPECIES MUESTRADAS	SEXO				TOTAL
	HEMBRA		MACHO		
	n	%	n	%	
S. del atlántico	171	71,85	67	28,15	238
S. coho	1.580	74,92	529	25,08	2.109
S. coho retornante	67	74,44	23	25,56	90
Trucha arcoiris	64	75,29	21	24,71	85

Tabla N° 5

Distribución porcentual de las muestras de suero sanguíneo de reproductores salmonídeos analizadas por seroneutralización (método beta) según especie, período reproductivo Abril-Junio de 1999.

ESPECIES MUESTREADAS	n	%
S. del atlántico	8	11,11
S. coho	13	18,06
S. coho retomante	28	38,89
Trucha arcoiris	23	31,94
TOTAL	72	100,00

4.1.2. Material de laboratorio

Para realizar el estudio se utilizaron las dependencias y materiales del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, lo cual permitió realizar el procesamiento de las muestras, titulaciones, cultivo celular y seroneutralización. Las muestras destinadas a RT - PCR fueron preparadas y analizadas en el Laboratorio de Biotecnología e Inmunología Acuática de esta misma Facultad.

4.2. METODO**4.2.1. Cultivo celular****4.2.1.1. Toma de muestra**

Para llevar a cabo este proceso, durante los meses de Abril, Mayo y Junio de 1999, se realizaron pools de riñón y bazo de 5 reproductores de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), con el cual se constituyó una muestra de 1 a 1,5 gramos que fue puesta en un tubo que contenía 9 ml de MEM al 2% de suero fetal y 4 x Ab, obteniéndose así una dilución de 1:10.

4.2.1.2. Macerado y obtención de sobrenadante

La dilución obtenida de las muestras fue colocada en un mortero previamente enfriado donde se le adicionó arena estéril para facilitar su maceración. Luego de esto, se procedió a centrifugar a 4.500 r.p.m. por 10 minutos para así extraer al menos 5 ml de sobrenadante que fue guardado como contramuestra y también para realizar las diluciones posteriormente utilizadas.

4.2.1.3. Inoculación y lectura del resultado

Para realizar las diluciones requeridas para esta inoculación, se colocaron 0,1 y 0,2 ml de sobrenadante en 0,9 y 0,8 ml de MEM al 2% de suero fetal bovino con 1 x Ab, con el objeto de obtener una dilución 1:100 y 1:50, respectivamente. Luego se inoculó 0,1 ml de cada una de estas diluciones a un pocilio de una placa de 24 pocilios que contenía una monocapa de células CHSE-214, de 24 horas de incubación; cada dilución se sembró en duplicado.

La adsorción se realizó a 15°C por 1 hora, luego de lo cual se adicionó 1 ml de medio de cultivo MEM al 2% de suero fetal con 1 x Ab a cada pocilio, para inmediatamente incubar a 15°C por 7 días y así observar diariamente el efecto citopático, confirmando de esta forma la presencia del virus. En cada placa se consideraron controles de células.

Posteriormente a esta lectura, se procedió a congelar las placas a -20°C por 24 horas con el fin de favorecer el rompimiento de las células y la liberación de los virus existentes a la descongelación, que se llevó a cabo con temperatura de refrigeración.

Para la realización del segundo pasaje, se extrajo conjuntamente desde los pocilios el sobrenadante de las 2 diluciones, lo cual luego de ser centrifugado a 3.500 r.p.m. por 5 minutos, se sembró directamente en duplicado sobre pocilios que contenían una monocapa de células CHSE-214. La adsorción, adición del medio e incubación para la lectura de CPE fue realizada de igual forma que en el pasaje anterior.

Se consideró negativa toda muestra que no desarrolló efecto citopático después del segundo pasaje. Las muestras positivas, es decir aquellas que desarrollaron CPE, fueron confirmadas individualmente por RT - PCR.

4.2.2. Prueba de seroneutralización (método beta)

4.2.2.1. Titulación viral

El título viral se obtuvo a partir de la realización de diluciones en logio de la suspensión del aislado nacional de salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) del

virus IPN. Para esto se colocó en tubos 0,1 ml de la suspensión del virus en 0,9 ml de MEM al 2% de suero fetal bovino y 1 x Ab (dilución 10^{-1}) hasta llegar a la dilución 10^{-8} , posterior a lo cual se adicionó 0,1 ml de cada una de estas diluciones en una microplaca de titulación que contenía 0,1 ml de solución con células CHSE-214; cada dilución se inoculó por sextuplicado. Luego se incubó por 7 días a 15°C para realizar la lectura del efecto citopático (CPE) y cálculo del título viral en TCID_{50} / ml, el cual en este caso fue de $10^{4,7}$ TCID_{50} / ml.

4.2.2.2. Inoculación y lectura del resultado

Esta prueba se realizó en cultivos celulares en microplacas para detectar y cuantificar anticuerpos contra el virus IPN en suero sanguíneo de reproductores de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los sueros sanguíneos recibidos se centrifugaron a 3.000 r.p.m. por 5 minutos y se congelaron a -18°C para su conservación. Posteriormente fueron inactivados a 56°C por 30 minutos, con la finalidad de inactivar el complemento y posibles virus inhibitorios no específicos (Fenner y col., 1987). Luego se utilizó por cada suero, sin diluir, 2 pocillos con 50 μl cada uno, a los que posteriormente se adicionó 50 TCID_{50} / ml del aislado nacional de IPNV contenidas en 50 μl de suspensión viral. En cada placa se consideró la inclusión de controles de células y de células-virus, lo cual permitió observar su comportamiento así como también su uso como punto de comparación al momento de leer las microplacas e interpretar los resultados. Por otro lado, paralelamente a esto se realizó una titulación control de la suspensión viral utilizada.

La mezcla suero - virus se incubó a 20°C por 1 hora, posterior a lo cual se adicionaron 100 μl de solución con células CHSE-214 (2% suero fetal y 1 x Ab) por cada pocilio. Finalizado esto, la microplaca se incubó a 15°C por 7 días, período en el cual se fue observando la presencia o ausencia de CPE de acuerdo a los niveles de anticuerpos presentes contra IPNV.

Los sueros problema que resultaron positivos, es decir con ausencia de CPE, fueron titulados en \log_2 .

4.2.2.3. Titulación de los anticuerpos

Se realizó mediante diluciones del suero sanguíneo problema en \log_2 desde 2^{-1} hasta 2^{-8} .

Para ello se utilizó un cuadrante de 2 columnas y 8 filas por suero en la microplaca. En la primera fila se colocaron 50 µl de suero problema a cada pocilio, luego se adicionó a todos los pocillos 50 µl de MEM al 2% de suero fetal bovino y se diluyó mediante palillos dilutores de 50 µl desde la primera fila hacia abajo, de forma tal que en cada uno de los pocillos resultó un volumen de 50 µl de suero sanguíneo ya diluido.

Posteriormente se agregaron 50 TCID₅₀ del aislado nacional de IPNV contenidas en 50 µl de suspensión viral, a cada uno de los pocillos.

La mezcla suero-virus se incubó por 1 hora a 20°C. Terminada la incubación se agregó a cada pocilio 100 µl de solución con células CHSE-214 (2% suero fetal y 1 x Ab) y nuevamente se incubó a 15°C por 7 días.

Pasado este tiempo se obtuvieron los resultados, basándose en el efecto citopático observado.

4.2.3. RT - PCR

Las muestras de riñon-bazo de reproductores salmonídeos que a la observación macroscópica no fueron consideradas aptas para la realización de la técnica de cultivo celular, se derivaron al estudio mediante RT - PCR (anexo N° 1). De igual forma ocurrió con las muestras que resultaron positivas por cultivo celular a IPNV, las cuales fueron analizadas en forma individual por esta técnica con la finalidad de obtener un diagnóstico confirmativo.

4.2.4. Estudio de frecuencia del virus IPN

La frecuencia expresada en porcentaje de muestras de reproductores salmonídeos positivos a IPNV, fue calculada en base al total de muestras analizadas durante el período reproductivo Abril-Junio de 1999, utilizándose elementos de estadística descriptiva y considerando variables como sexo y especies estudiadas.

5. RESULTADOS

5.1. Cultivo celular en CHSE-214 y confirmación por RT - PCR

A continuación se presentan los resultados de las muestras de riñon-bazo de reproductores salmonídeos analizadas por cultivo celular y confirmadas por RT - PCR.

Tabla N° 6

Positividad a IPNV en muestras de riñon-bazo de reproductores de salmón del Atlántico (*S. salar*), salmón Coho (*O. kisutch*) y trucha Arcoiris (*O. mykiss*) analizadas por cultivo celular en CHSE-214 y confirmado por RT - PCR, período reproductivo Abril-Junio de 1999.

ESPECIES MUESTREADAS	N° TOTAL DE MUESTRAS	N° / % DE MUESTRAS POSITIVAS	% TOTAL
S. del atlántico	1.273	6 / 0,47	0,14
S. coho	2.797	54/1,93	1,27
S. coho retomante	90	0 / 0,00	0,00
Trucha arcoiris	85	2 / 2,35	0,05
TOTAL	4.245	62	1,46

De esta tabla se desprende que el 1,46% del total de muestras analizadas resultaron positivas a IPNV, distribuyéndose de la siguiente forma: 6 salmónes del atlántico (0,14%), 54 salmónes coho (1,27%) y 2 truchas arcoiris (0,05%). Los salmónes cohos retornantes no presentaron diagnóstico a IPNV.

En relación al porcentaje de muestras positivas con respecto al total de su especie, el valor más alto se observa en la trucha arcoiris con un 2,35%, seguido del salmón coho (1,93%) y del salmón del atlántico (0,47%).

Tabla N° 7

Positividad a IPNV en muestras de riñon-bazo de reproductores de salmón del Atlántico (*S. salar*), salmón Coho (*O. kisutch*) y trucha Arcoiris (*O. mykiss*) analizadas por cultivo celular en CHSE-214 y confirmado por RT - PCR según sexo, período reproductivo Abril-Junio de 1999.

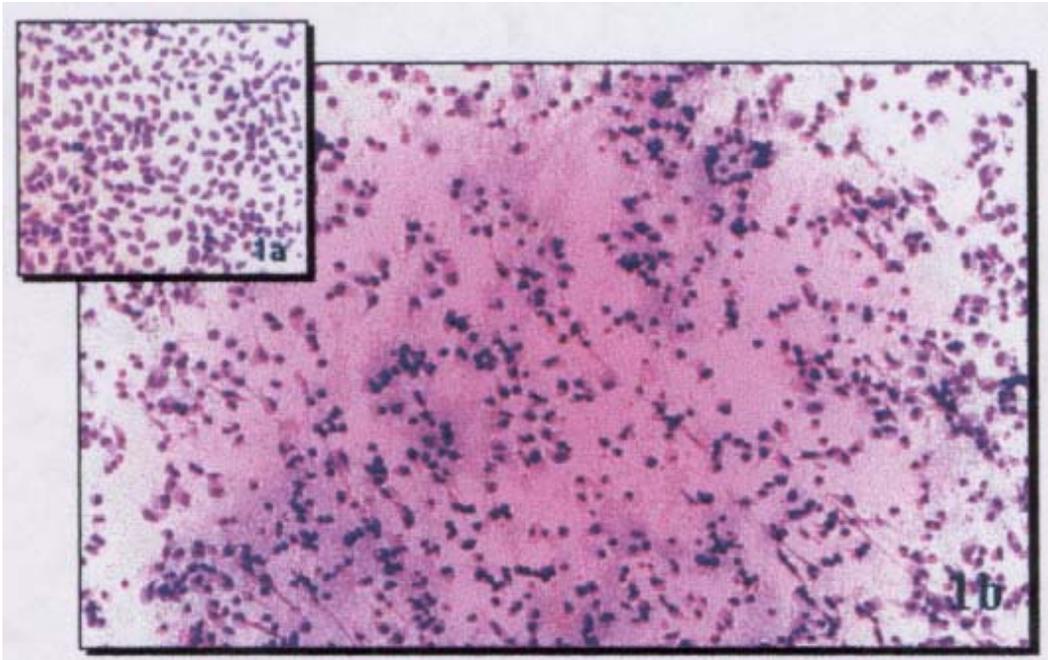
ESPECIES MUESTREADAS	SEXO			
	HEMBRA		MACHO	
	+ / n	%	+ / n	%
S. del atlántico	3 / 921	0,33	3 / 352	0,85
S. coho	29 / 2.067	1,40	25 / 730	3,42
S. coho retornante	0 / 67	0,00	0 / 23	0,00
Trucha arcoiris	2 / 64	3,13	0 / 21	0,00
TOTAL	34 / 3.119	1,09	28 / 1.126	2,49

En esta tabla se presenta el número total de muestras analizadas según el sexo de los reproductores y su distribución de acuerdo a cada especie.

Es así como en el caso de las hembras, un 1,09% del total de muestras resultaron positivas a IPNV, destacándose la trucha arcoiris que presentó un porcentaje de positividad de 3,13% del total de su especie, seguida del salmón coho con 1,40% y salmón del atlántico con 0,33%.

Con respecto a los machos de estos reproductores, se observa que de 1.126 muestras analizadas un 2,49% presentó positividad a IPNV, lo cual se encuentra representado sólo por salmón coho (3,42%) y salmón del atlántico (0,85%).

El salmón coho retomante, en ambos sexos, no presentó resultados positivos a IPNV.

**Foto N° 1a**

Monocapa de la línea celular CHSE-214 no inoculada (Giemsa 408x).

Foto N° 1b

Monocapa de CHSE-214 con CPE producto de la replicación del virus IPN, después de inocular la dilución 1:10 del sobrenadante de riñon-bazo de reproductores salmonídeos positivos a IPNV (Giemsa 408x).

5.2. RT - PCR

Los resultados del análisis de muestras de riñon-bazo de reproductores salmonídeos por RT - PCR para detectar IPNV se presentan en la siguiente tabla.

Tabla N° 8

Positividad a IPNV en muestras de riñon-bazo de reproductores de salmón del Atlántico (*S. salar*) y salmón Coho (*O. kisutch*) analizadas por RT - PCR, período reproductivo Abril-Junio de 1999.

ESPECIES MUESTREADAS	N° TOTAL DE MUESTRAS	N° / % DE MUESTRAS POSITIVAS	% TOTAL
S. del atlántico	229	9 / 3,93	2,45
S. coho	138	0 / 0,00	0,00
TOTAL	367	9	2,45

En esta tabla se observa que de un total de 367 muestras analizadas de dos especies de salmónidos, 2,45% de ellas resultaron positivas a IPNV, correspondiendo en este caso sólo a salmón del atlántico. Dentro de su especie, estas 9 muestras representan un 3,93%.

Con respecto al sexo de estos reproductores analizados por RT-PCR, cabe señalar que los resultados positivos a IPNV observados en salmón del atlántico corresponden en el caso de las hembras a un 1,56% del total de ellas (257), y en los machos a un 4,55% del total de ellos (110). Dentro de su especie, estos valores representan un 2,6% en las hembras (154) y un 6,67% en los machos (75).



Foto N° 2

RT - PCR (IPNV). Corrida electroforética en gel de agarosa al 1,5% de la reacción de RT-PCR.

Bandas a y d : muestras de reproductores salmonídeos negativas a IPNV

Bandas b, c, e y f: muestras de reproductores salmonídeos positivas a IPNV

Banda g : control positivo

Banda h : control negativo (células no inoculadas)

Banda i: marcador de pesos moleculares (fago Lambda cortado con HindIII)

5.3. Seroneutralización

Al observar los resultados de las muestras de suero sanguíneo de reproductores salmonídeos analizadas por la técnica de seroneutralización-método beta, cabe señalar que de un total de 72 muestras, 8 de s. del atlántico, 13 de s. coho, 28 de s. coho retornante y 23 de trucha arcoiris, 2,78% de ellas resultaron positivas a IPNV, correspondiendo en este caso sólo a trucha arcoiris. El título neutralizante de los anticuerpos se observó sólo en la dilución 1:2. Dentro de su especie, estas 2 muestras de trucha arcoiris representan un 8,70%.

6. DISCUSION

El gran desarrollo e intensificación alcanzado en los últimos años por la salmonicultura nacional, ha conllevado la aparición de nuevas enfermedades como la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), enfermedad viral sistémica aguda que está siendo un gran desafío para esta industria debido al impacto económico que se deriva de ella. Es así como los datos a la fecha indican que en Chile este impacto en agua dulce ha sido relativamente bajo, pero en cultivos de la zona estuarina y mar se han producido severos brotes que han alcanzado de un 30 a 40% de mortalidad (Bustos y col., 1999).

Es importante mencionar que este es el primer estudio que se realiza en nuestro país, en el cual se determina la presencia del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en reproductores de salmón del Atlántico (*S. salar*), salmón Coho (*O. kisutch*) y trucha Arcoiris (*O. mykiss*) en empresas salmoneras de la Décima y Undécima regiones de nuestro país; hasta el momento sólo se tiene información estimada de mortalidad general y aislamiento de este virus.

De un total de 4.245 muestras analizadas por cultivo celular y confirmadas por RT - PCR (Tabla N° 6), se observó que un 1,46% de ellas (62 / 4.245) resultaron positivas a IPNV, correspondiendo el valor más alto a salmón coho con un 1,27%, seguido de salmón del atlántico (0,14%) y trucha arcoiris (0,05%). Sin embargo, al analizar el porcentaje de muestras positivas con respecto al total de su especie, se apreció que el valor más alto correspondió a trucha arcoiris, que presentó un 2,35% (2 / 85) de positividad a IPNV, seguida luego de salmón coho y salmón del atlántico que alcanzaron un 1,93% (54 / 2.797) y un 0,47% (6 / 1.273), respectivamente.

Al analizar los datos de estas mismas muestras, pero tomando en cuenta el sexo de los reproductores (Tabla N° 7), se determinó que el porcentaje más alto de positividad a IPNV corresponde a los machos con un 2,49% del total de ellos; las hembras sólo presentaron un 1,09%. Por otro lado, también podemos deducir que los resultados positivos a IPNV en trucha arcoiris sólo se encuentran dados por las hembras de esta especie, que aportan un valor de 3,13%; el hecho anterior explica que en el caso de este sexo sean tres las especies afectadas, y en los machos sólo las dos restantes: salmón del atlántico y salmón coho, siendo este último el que presenta el porcentaje mayor de positivos a IPNV (3,42%) en relación al total de su especie.

Al comparar los resultados de las especies en estudio y la trucha arcoiris, se observa que en esta última los porcentajes de muestras positivas con respecto a su especie son mayores. Esto se explica a través de la mayor significancia que obtiene el número de muestras positivas dentro del total de ellas, en comparación con el de las otras especies analizadas.

Según Dorson (1988), algunas especies de salmónidos son claramente reconocidas como resistentes a IPNV, como por ejemplo salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio podemos observar claramente que es esta especie la que presenta el mayor porcentaje de resultados positivos a IPNV del total de muestras analizadas por cultivo celular y confirmadas por RT - PCR, lo cual nos permite deducir que si bien esta especie no desarrolla un cuadro clínico tan evidente como el salmón del atlántico y trucha arcoiris, si estaría actuando como la especie portadora del virus en los sistemas intensivos de cultivo de salmones en nuestro país. Wolf y col. (1963) y Yamamoto (1975) indican que el estado de portador puede durar años y afectar al 90% de los individuos sobrevivientes.

En el estudio de muestras realizado por RT - PCR (Tabla N° 8), se aprecia que sólo el salmón del atlántico presentó positividad a IPNV, lo cual dentro de su especie corresponde a un 3,93%. Por su parte, al considerar el sexo de estos reproductores analizados, se observa que en esta especie las hembras presentaron un 2,6% de resultados positivos y los machos un 6,67%.

Al comparar los datos epidemiológicos dados por la literatura (Stoskopf, 1992) y aquellos obtenidos en este estudio, llama la atención que en este último se hayan encontrado diferencias relacionadas con el sexo de los reproductores, pues en el caso de las dos técnicas analizadas previamente se puede apreciar que los machos aparecen con un porcentaje mayor de resultados positivos a IPNV. Este hallazgo nos indica la importancia que tiene el reproductor macho como portador del virus y en consecuencia, en la transmisión vertical de la enfermedad, puesto que al ser utilizado uno de ellos en la fecundación de dos a cuatro hembras, el efecto multiplicador que adquiere en esta patología es crucial. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para profundizar estos resultados.

Por otro lado, al analizar comparativamente los resultados de las técnicas de cultivo celular y RT - PCR, se encontró una marcada diferencia con respecto a la especie que resultó con mayor porcentaje de positividad a IPNV. En el caso de cultivo celular en CHSE-214 y confirmación por RT - PCR, esta especie correspondió a salmón coho, con un 1,27% del total de muestras analizadas; por el contrario, en el caso de la técnica de RT - PCR esta especie correspondía a salmón del atlántico, el cual presentó un 2,45% de resultados positivos a IPNV del total de muestras analizadas por esta técnica.

La situación anterior podría explicarse debido a que la técnica de RT - PCR, a pesar de su alta sensibilidad, especificidad y rapidez (Oliveira, 1999), está influenciada por el tipo de muestra, enzimas y temperatura utilizadas; además de que no sólo detecta el virus activo, sino también fragmentos de él, lo cual podría alterar la interpretación del resultado de la amplificación. En el caso de la técnica de cultivo celular, el mayor inconveniente es el tiempo relativamente largo, necesario para completar el diagnóstico (Oliveira, 1999). Sin embargo, actualmente es ampliamente utilizada por tratarse de una técnica estandarizada y validada internacionalmente (O.I.E., 1997) y que sólo detecta el virus activo, el cual a su vez es el que persiste en el tiempo.

De las 72 muestras de suero sanguíneo analizadas por seroneutralización (método beta), podemos señalar que en este caso sólo la especie trucha arcoiris mostró presencia de IPNV (2,78%), valor que dentro de su especie representa un 8,7%. A su vez, estos títulos neutralizantes medidos en \log_2 solamente se observaron en la dilución más baja (1:2), lo cual nos indicaría la existencia de bajos niveles de anticuerpos neutralizantes contra IPNV en el suero sanguíneo de estos reproductores. Con respecto a esto, cabe señalar que estos resultados pudieran estar influenciados por la crítica estabilidad de los anticuerpos de peces, los cuales en general se destruyen fácilmente (Parias, 1999. Comunicación personal)*. Además, en la trucha se ha descrito la presencia del factor sérico 6S capaz de inactivar el virus IPN, lo cual explicaría la resistencia a esta enfermedad de los peces mayores de 3 meses (Dorson y col., 1974; Kelly y col., 1985; Wolf, 1988).

Por su parte, en este estudio no se observó, en ninguno de los casos, presencia del virus IPN en reproductores de salmón coho retomante, lo cual nos permite deducir que estos peces no estarían actuando como portadores del virus en la naturaleza; por lo tanto, esta virosis se concentraría en las especies salmonídeas cultivadas intensivamente. Este hallazgo concuerda con datos mencionados por Bustos y col. (1999), donde señala que en Noruega el virus ha sido aislado muy pocas veces en salmón silvestre, a pesar de que la enfermedad es considerada endémica en los centros de cultivo en el mar.

El virus IPN puede ser transmitido por vía horizontal, que es la vía de contagio más frecuente, y por la vía vertical, a través del fluido seminal y ovárico, así como de ovas embrionadas procedentes de reproductores infectados (Ahne y Negele, 1985; Bootland y col., 1991). Por otro lado, se ha demostrado que individuos sobrevivientes de una epizootia pueden convertirse en portadores crónicos y asintomáticos, diseminando el virus y provocando el contagio a peces sanos (Wolf y col., 1963; Yamamoto, 1975); en el caso de reproductores portadores, los alevines

* Dr. Carlos Panas
Inst. Patología Animal
Universidad Austral de Chile

obtenidos a partir de ellos pueden experimentar mortalidades de hasta el 100% (Oliveira, 1999).

De acuerdo a lo citado previamente y basándonos en los datos obtenidos, se puede anticipar que se vislumbran importantes problemas para la industria del salmón, principalmente si aun existen dudas acerca de las medidas preventivas y profilácticas que se deben adoptar para impedir el crecimiento explosivo de este virus entre los planteles de cultivo (Bravo, 1999). Con respecto a estas medidas, cabe señalar que los peces que han tenido IPN pueden volverse parcialmente inmunes y/o quedar como portadores del virus. Es así que la vacunación de salmones produciría una respuesta inmunológica, lo cual nos estaría indicando que la prevención mediante la vacunación es posible. Por otra parte, los diferentes serotipos del virus reaccionan en forma cruzada al test de seroneutralización, haciendo posible que una vacuna basada en un serotipo determinado pueda proteger contra los distintos serotipos del virus (Bustos y col., 1999).

Vacunas inyectables para uso en pre-smolt, con virus inactivado o vacunas que incluyen subunidades del virus (recombinantes) se encuentran en el mercado noruego y chileno, pero los permisos para su venta son transitorios. El efecto de las vacunas sería mediante una menor excreción del virus al medio y la formación de anticuerpos (Bustos y col., 1999).

En 1998 se importaron casi 91 millones de ovas, cifra inferior a la registrada en años anteriores pero aún significativa, por cuanto la producción de ovas nacionales sólo cubre la mitad de la demanda (Asociación de productores de salmón y trucha de Chile A.G., 1998). De esta forma, dado que en nuestro país se han importado ovas desde Europa y Norteamérica y esta enfermedad se transmite verticalmente a través de las ovas, se encuentran presentes los dos serotipos del virus IPN más patógenos: el Sp y el VR-299 (Bustos y col., 1999). Esto pone en evidencia que la desinfección de ovas fertilizadas con yodóforos no evita totalmente la transmisión del virus a la progenie debido a que puede encontrarse dentro de la ova y a que puede también ser transmitido a través del espermio (Bullock y col., 1976; Wolf, 1988). Por ello, un programa de screening de los reproductores y eliminación total de las progenies en caso de que uno de ellos sea positivo es una alternativa de control eficaz si es que todas las medidas complementarias se integran de modo eficiente.

7. CONCLUSIONES

- El análisis de muestras realizado mediante cultivo celular y confirmado por RT PCR mostró que un 1,46% de ellas fueron positivas a IPNV. La frecuencia más alta correspondió a salmón coho (1,27%).
- Por especie, el mayor valor porcentual de peces positivos a IPNV corresponde a trucha arcoiris, lo cual puede estar influenciado por el tamaño muestral.
- La especie salmón coho estaría actuando como portadora del virus en los cultivos intensivos de salmónidos.
- En el estudio realizado por RT - PCR sólo el salmón del atlántico fue positivo a IPNV, con una frecuencia de 2,45% del total de muestras analizadas.
- En los machos se observó un porcentaje mayor de resultados positivos a IPNV, lo cual tendría una gran importancia en la transmisión vertical de esta enfermedad debido a su efecto multiplicador.
- El 2,78% de las muestras analizadas por seroneutralización (método beta) fueron positivas a IPNV, correspondiendo sólo a la especie trucha arcoiris. Este resultado podría explicarse por la crítica estabilidad de los anticuerpos de peces y a la presencia del factor sérico 6S en la trucha.
- En reproductores de salmón coho retornante no se observó la presencia del virus IPN, lo cual haría suponer que no estarían actuando como portadores del virus en la naturaleza.

8. BIBLIOGRAFIA

AHNE, W. y NEGELE, R.D. 1985. Studies of the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. Fish and Shellfish Pathology (edited by Ellis AE): 261-269. Academic Press, London.

AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 1999. (Ed.) Martha L. Lozano. Identificadas cepas de IPN. N° 47: p.19.

ASOCIACION DE PRODUCTORES DE SALMON Y TRUCHA DE CHILE A.G. 1998 Memoria Anual 1998: 33-36.

BOOTLAND, L.; DOBOS, P. y STEVENSON, R. 1991. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. Diseases of Aquatic Organisms 10: 13-21.

BRAVO, S. 1999. Efectos del IPN en la acuicultura. Chile Pesquero 110: 54-55.

BROWN, F. 1986. The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. Intervirology 25: 141-143.

BULLOCK, G.; RUCKER, R.; AMENO, D.; WOLF, K. y STUCKEY, H. 1976 Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine treated and non treated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). J. Fish. Res. Board Can. 33: 1197-1198.

BUSTOS, P. 1993. Nuevo desafío para la acuicultura. Aquanoticias Internacional 16: 53.

BUSTOS, P.; MIDTLYNG, P. y MAIRA, C. 1999. IPN: un enorme desafío para la industria salmonera. Aquanoticias Internacional 48: 48-51.

CALDERON, Y. 1998. Determinación de la virulencia de dos cepas del virus IPN en *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias, U.A.CH. Valdivia.

CASTRIC, J. y CHASTEL, C. 1980. Isolation and characterization attempts of 3 viruses from European eel, *Anguilla anguilla*: preliminary results. Annls Virol. (Inst. Pasteur). 131 E: 435-48.

DE KINKELIN, P.; MICHEL, CH. y GHITTINO, P. 1991. Tratado de las enfermedades de los peces. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España.

DORSON, M. y DE KINKELIN, P. 1974. Necrose pancreatique infectieuse des salmonides: existence dans le serum de traites indemnes d'une molecule 6S neutralisant specifiquement le virus. Cr. Acad. Sci. Paris Ser. D. 278: 785-788.

DORSON, M. y TORCHY, C. 1985. Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus via the sexual products. Fish and Shellfish Pathology (edited by Ellis AE): 251-260. Academic Press, London.

DORSON, M. 1988. Fish Vaccination. Ed. Academic Press. London.

FENNER, F.; BACHMANN, P.; GIBBS, P.; MURPHY, F.; STUDDERT, M. y WHITE, D. 1987. Veterinary virology. Ed. Academic Press Inc. Ltd. San Diego.

HILL, B. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In Microbial Diseases of Fish, Ed. R. J. Roberts. Academic Press. London.

HILL, B. y WAY, K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. Annual Review of Fish Diseases 5: 55-77.

JARP, J.; GJEVRE, A.; OLSEN, A. y BRUHEIM, T. 1994 Risk factors for furunculosis, infectious pancreatic necrosis and mortality in post-smolt of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases 17: 67-78.

KELLY, R.K. y NIELSEN, O. 1985. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus by serum from normal rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Canadian hatcheries. Fish Pathology 19: 245-251.

McALLISTER, P. E. y REYES, X. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, imported into Chile. J. Fish Dis. 7: 319-322.

McALLISTER, P.; OWENS, W. y RUPPENTHAL, T. 1987 Detection of infectious pancreatic necrosis virus in polluted cell and particulate components from varian fluid of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Dis. Aquat. Org. 2: 235-237.

McKNIGHT, L y ROBERTS, R. 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. Br. Vet. J. 132: 76-85.

MENDEZ, R. 1988. Desarrollo y situación actual de los cultivos de salmonídeos. Chile Pesquero 39: 21-24.

MENDEZ, R. 1999. Compendio de la acuicultura y la pesca de Chile. Ed. Antártica Quebecor S. A. Santiago, Chile.

MURPHY, F. A. 1995. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Springer-Verlag, Wien.

O.I.E. 1997. Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Ed. Office international des epizooties, París, Francia.

OLVEIRA, J. 1999. Optimización de la técnica de RT-PCR para la detección de bimavirus acuáticos. Tesis de licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela, España: 3-36.

POST, G. 1983. Textbook of fish health. Ed. TFH.

QUAGLIO, F. 1989. Infectious disease from birnavirus with particular reference to infectious pancreatic necrosis of salmonids. Riv. Ital. Acquacol. 24: 167-179.

REYES, X. 1983. Rol de la enfermedad en el desarrollo de los cultivos intensivos de salmónidos. Análisis de pesquerías chilenas. Valparaíso: 62-69.

REYES, X. 1985. Bases técnicas para la formulación de un control sanitario en los cultivos de salmonídeos. En: **Melo, T.** Estudio de pesquerías chilenas. Escuela de Ciencias del Mar, U.C.V., Valparaíso: 62-69.

ROBERTS, R. 1989. Fish pathology. Ed. Baillière Tindall, London, Inglaterra.

ROSENLUND, B. 1977. Infectious pancreatic necrosis virus at the Willow Beach NFH, Nevada, and in rainbow trout stocked into adjacent Lake Mohave. Fish Health News 6: 10-13.

SANO, T. 1995. Viruses and viral diseases of salmonids. Aquaculture 132: 43-52.

STANGELAND, K.; HOIE, S. y TAKSDALJ. 1996. Journal of Fish Diseases 19: 323-327.

STOSKOPF, M. 1992. Fish Medicine. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia.

SWANSON, R. 1981. An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues. Journal of Fish Diseases 4: 309-315.

WOLF, K.; QUIMBY, M. y BRADFORD, A. 1963. Egg-associated transmission of IPN virus of trouts. Virology 21: 317-321.

WOLF, K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Ed. Ithaca, New York.

YAMAMOTO, T. 1975. Frequency of detection and survival of infectious pancreatic necrosis virus in a carrier population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in a lake. J. Fish. Res. Board Can. 32: 568-570.

9. ANEXOS

Anexo N° 1: RT- PCR.

Esta técnica se basa esencialmente en la detección de secuencias de RNA específicas presentes en el genoma viral de IPNV.

Para ello, en primer lugar se realiza la extracción del RNA viral desde las muestras de sobrenadante de riñon-bazo de reproductores salmonídeos mantenidas en refrigeración, luego de lo cual se aplica la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), acoplada con la reacción de transcriptasa reversa (RT) para así lograr la obtención del DNA complementario (cDNA) a partir del RNA viral. Para tal reacción, se utilizan primers o partidores oligonucleotídicos complementarios a una secuencia específica del RNA viral.

Una vez concluida la síntesis del cDNA, este se utiliza en la posterior reacción de PCR que amplificará el cDNA sintetizado mediante una serie de ciclos repetitivos que involucran las siguientes etapas:

- Denaturalización, en la cual las dos hebras de la molécula de cDNA se separan mediante calentamiento de la disolución a 95°C.
- Hibridación de los partidores, en donde la disolución se enfría bruscamente a una temperatura que permite a cada uno de ellos hibridarse a una región específica de la hebra de cDNA.
- Síntesis de cDNA. Aquí la disolución se calienta a 72°C, temperatura óptima en la cual la DNA polimerasa permite la síntesis del DNA a partir de los primers, lográndose de esta forma la amplificación del fragmento específico de DNA.

Finalmente dicho fragmento es analizado en un gel de agarosa al 1,5% por tinción con bromo de etidio y visualizado en un transluminador por luz U.V.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a mi profesor patrocinante Dr. Ricardo Enríquez por su constante ayuda y buena disposición.

A la Sra. Mónica Monrás por su desinteresada colaboración y apoyo.

A todos los miembros de la Unidad de Ictiopatología del Instituto de Patología Animal, que contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

A los docentes y tesistas del Instituto de Acuicultura y Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela (España) por su gran ayuda y colaboración en la realización de esta tesis.

A Roberto por su incondicional apoyo y comprensión.

A mis amigos, que de una u otra forma contribuyeron día a día a la culminación de este trabajo.