




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

**Inoculación de *S. Coho (O. kisutch)* con sobrenadantes de órganos de  
*S. Atlántico (S.salar)* afectados con "Leucemia Linfoblástica"**

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


**Osiel Eduardo Guzmán Muñoz**  
**Valdivia Chile 2000**

**PROFESOR PATROCINANTE:**



**DR. RICARDO ENRIQUEZ S.**

**COLABORADOR:**



**T.M. MONICA MONRAS S.**

**PROFESORES CALIFICADORES:**



**Dr. ENRIQUE PAREDES H.**



**Dr. GERMAN REINHARDT V.**

**FECHA DE APROBACION:**

**02 DE NOVIEMBRE DEL 2000**

## INDICE

	<b>Pag.</b>
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
4. MATERIAL Y METODO.....	7
5. RESULTADOS.....	15
6. DISCUSION.....	26
7. CONCLUSIONES.....	31
8. BIBLIOGRAFIA.....	32
9. ANEXOS.....	36

## 1. RESUMEN

*"Inoculación de S. Coho (O. kisutch) con Sobrenadantes de órganos de S. Atlántico (S. salar) afectados con "Leucemia Linfoblástica".*

Con el fin de determinar la susceptibilidad de salmón coho (*O. kisutch*) a la inoculación de homogeneizados de órganos de salmón del atlántico (*S. Salar*) enfermos de Leucemia Linfoblástica (L.L.), estudiar el cuadro clínico y verificar la presencia del parásito microsporidio *Nucleospora salmonis* y/o el retrovirus "Salmón Leukemia Virus" (SLV: Virus de la Leucemia del Salmón), se procedió a inocular 125 s. coho con cuatro preparados de s. atlántico provenientes de fase de mar e infectados naturalmente de L.L.: 1) Sobrenadante crudo de bazo, cerebro y riñón (SCR); 2) Sobrenadante de bazo, cerebro y riñón filtrado por poro 1.2  $\mu$ m. (S.F. 1.2); 3) Sobrenadante de bazo, cerebro y riñón filtrado por 0.2  $\mu$ m. (S.F. 0.2); 4) Aislado de linfocitos provenientes de sangre y riñón (Linfocitos) 5) Grupo control inoculado con MEM.

Los cuatro grupos de s.coho inoculados, presentaron mortalidades asociadas a Leucemia Linfoblástica con signología externa consistente en palidez branquial, exoftalmia bilateral, natación errática, melanosis y bajo consumo de alimento.

Internamente se caracterizó por un elevado número de peces que presentaron hepatomegalia y renomegalia y en menor grado ascitis, enteritis y palidez hepática. El examen microscópico mediante tinción de Gram/Giemsa de improntas de hígado, bazo y riñón mostró la presencia de esporas de *Nucleospora salmonis* en los grupos inoculados con SCR., S.F. 1.2 y Linfocitos siendo el riñón el órgano de mayor frecuencia de hallazgo.

Los estudios sanguíneos demostraron anemia en los cuatro grupos experimentales, teniendo valores de hematocrito inferiores al 30%, capa flogística superior al 1%. Los frotis sanguíneos mostraron la presencia de linfoblastos. Para el caso de los grupos inoculados con SCR, S.F. 1.2 y Linfocitos se observaron cuerpos de inclusión intranucleares en linfocitos y linfoblastos y la presencia de algunas esporas circulantes de forma libre. Histológicamente se detectó Leucemia Linfoblástica en bazo y riñón de los grupos SCR, S.F. 0.2 y Linfocitos (un pez en cada grupo). Mediante el uso de microscopía electrónica se visualizó algunas panículas intracitoplasmáticas homologables a Virus de la Leucemia del Salmón.

Palabras claves: Leucemia Linfoblástica - *Nucleospora salmonis* - Microsporidiosis - Leucemia Plasmacitoídea - Salmón Leukemia Virus.

## 2. SUMMARY

*"Inoculation of Coho Salmon (*O. kisutch*) with homogenized organs of Atlantic Salmon (*S. salar*) with "Linfoblastic Leukemia "*

The purpose of this experiment was to determine the susceptibility of coho salmon (***O. kisutch***) to the inoculation of homogenized organs of atlantic salmon (***S. salar***) with signs of Linfoblastic Leukemia and to study the clinical signs induced by the different inoculums, associating them with the presence of the microsporidian parasite ***Nucleospora salmonis***.

One hundred and twenty five ***O. kisutch*** were inoculated with four prepareds made with tissues of ***S. salar*** reared in seawater: homogenized tissue of spleen, brain and kidney (HCR); homogeneized of spleen, brain and kidney passed through 1.2 um. filter (RF. 1.2); homogeneized of spleen, brain and kidney passed through 0.2 um. filter (RF. 0.2), an isolated of ***S. salar*** mononuclear leukocytes from blood and pronephric tissue (Linfocites), and a Control group inoculated with MEM.

The four groups inoculated with ***S. salar*** tissues presented mortalities associated to Linfoblastic Leukemia with external signs such as pale gills, exoftalmous, erratic swimming, dark color and low rates of appetite. Frequently, the necropsy showed esplenomegalia and renomegalia and in low rates: ascitis, enteritis and pale liver. The microscopy exam of the liver, spleen and kidney imprintings showed the presence of ***Nucleospora salmonis*** in HCR., H.F. 1.2 . and Linfocites groups. The kidney was the target tissue.

The blood tests showed anemia in these four experimental groups with less than 30% of hematocrite and a folgistic cape over 1%. The blood spread showed the presence of Linfoblastic cells. In HCR., H.F. 1.2 and in Linfocites groups was observed intranuclear inclusion bodies, linfocites and linfoblastic cells, and some free circulating spores.

Histologically, it was diagnosed Linfoblastic Leukemia in spleen and kidney of HCR., H.F. 0.2 and Linfocites groups.

By the use of electron-microscopic examination it was observed some virus like particles similar to Salmon leukemia virus.

Key words: Linfoblastic Leukemia - *Nucleospora salmonis* - Plasmacytoid leukemia - Salmon Leukemia Virus - Microsporidiosis.

### 3. INTRODUCCION

En la actualidad, el 43.9% de las exportaciones totales del sector pesquero chileno provienen de la acuicultura, por lo que representa uno de los sectores de mayor importancia para el país. Durante 1998 se produjo un incremento del 7% en los retornos respecto de 1997, con un volumen total de ingresos del orden de 713 millones de dólares por concepto de exportaciones de salmón. Esto cumplió con las metas productivas esperadas, aún cuando el año 1998 resultó ser uno de los más tormentosos para la salmonicultura, empezando con dos crisis. En primer lugar la acusación de dumping y por otro lado, la crisis asiática que hizo caer los precios a niveles muy bajos, lo que generó considerables pérdidas. Afortunadamente como industria consolidada pudo enfrentar estos desafíos (Campos, 1999).

Chile históricamente ha mantenido ventajas comparativas, respecto de sus competidores, como ser: lugares aptos para la salmonicultura, bajos costos de mano de obra, cercanía a las fuentes productoras de harina de pescado, desfase estacional y aguas libres de contaminación (Hardy y Castro, 1992; Romero y Munita, 1994) pero sin duda todo el éxito a cono y largo plazo esta íntimamente relacionado con la presencia y capacidad de control de las ictioenfermedades, lo que cobra vital importancia, ya que Chile ha ido perdiendo paulatinamente la histórica ventaja como poseedor de un ambiente libre de enfermedades (Bustos, 1993; Méndez y Vidal, 1994).

En el hemisferio norte se ha detectado desde 1988, una enfermedad llamada "Leucemia Plasmacitoidea" (**L.P.**) que ha causado mortalidades en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) de cultivos marinos en la Columbia Británica, Canadá y Estados Unidos (Kent y col., 1990; Eaton y Kent, 1992). Los peces afectados pueden presentarse oscuros, letárgicos, nadan cerca de la superficie, con branquias pálidas, ascitis hemorrágica, exoftalmia bilateral, inflamación renal y hemorragias petequiales en las vísceras (Kent y Dawe, 1993). Los intestinos presentan engrosamiento de su pared o esporádicamente contenido seroso o serosanguinolento (Kent y col., 1990).

Esta enfermedad llamada también "Anemia Marina"<sup>1</sup> se ha caracterizado histológicamente por una proliferación e infiltración de plasmoblastos en los órganos viscerales y tejido retrocular (Eaton y Kent. 1992). Estas células se presentan pleomórficas, hipercromatínicas y de mayor tamaño que linfocitos de peces no afectados (Wongtavatchai y col., 1995).

Tras estudios de microscopía electrónica en tejidos hematopoyéticos de s. chinook enfermos de **L.P.**, se descubrió una partícula viral de 110 nm de diámetro con un core denso bien definido y que además presentó actividad

aumentada de la enzima transcriptasa reversa. También se descubrieron estructuras polipeptídicas similares a las encontradas en otros retrovirus por lo que tentativamente se ha clasificado como un retrovirus tipo C, denominándosele "Salmon Leukemia Virus" (SLV: Virus de la Leucemia del Salmón) (Eaton y Kent, 1992). Sin embargo, un parásito microsporidio intranuclear llamado **Enterocytozoon salmonis** ha causado anemia, linfoblastosis y condición de leucemia en s. chinook, afectando principalmente a la línea de los linfocitos. Esta condición está muy relacionada con la de **L.P.** descrita en la Columbia Británica (Chilmonczyk y col, 1991). El mecanismo por el cual este parásito genera una respuesta proliferativa en linfocitos se desconoce. (Wongtavatchai y col., 1993).

Este parásito es una de las más de 70 especies de microsporidios que han sido descritos afectando peces. Se trata de parásitos intracelulares pero que en general afectan al citoplasma celular y sólo uno, **Microsporidium rhabdofilia** se ha descrito anteriormente con un desarrollo intranuclear exclusivo (Elston y col., 1987). Estudios de secuencia de DNA ribosomal lo sitúan en el grupo de las Nucleosporas mostrando un 19,8 % de divergencia con respecto a **Enterocitozoon bieneusi**, necesitándose aún más pruebas genéticas para separar al género Nucleospora como un sinónimo menor de Enterocitozoon (Docker y col, 1997). Actualmente se denomina este parásito como **Nucleospora salmonis** (Hedrick.,1991).

Con respecto de la forma de diseminación de la **L.P.** solo se ha demostrado transmisión horizontal por cohabitación en agua dulce sin que se haya podido establecer algún mecanismo de contagio en agua salada. Aún se discute la posibilidad de transmisión vertical vía ova o esperma (Kent y col, 1993; Kent, 1997).

Una enfermedad similar denominada "Leucemia Linfoblástica" (**L.L.**) se ha presentado en Chile desde agosto de 1994 en salmón del atlántico (**Salmo salar** y salmón coho (**Oncorhynchus kisutch**), asociada a la presencia del parásito **Enterocytozoon salmonis**, y que también se ha demostrado por microscopía electrónica la existencia de partículas virales semejantes a Retrovirus (Enriquez y col., 1995). Los hallazgos más notorios a la necropsia son: acentuada anemia, esplenomegalia. hepatomegalia, renomegalia e histopatológicamente se describe una infiltración de linfoblastos en hígado, bazo y riñón (Suárez , 1997; Soto, 1997).

Esta patología también se presentó afectando un gran número de centros reproductivos de trucha arcoiris (**Oncorhynchus mykiss**) en Colorado, Estados Unidos, siendo más afectados los peces juveniles, contrastando con las truchas adultas en que el parásito no ha producido afecciones tan severas (Miller, 1996).

Al parecer el rango de temperatura óptimo para el desarrollo de *N. salmonis* ocurre entre 15° y 18° C, siendo prácticamente nulo a 9° C, sin embargo, estudios de laboratorio demuestran que estos peces desarrollan un cuadro exacerbado al aumentar la temperatura. El periodo de incubación de la enfermedad también se ve afectado por las condiciones del medio, bastando 53 días para evidenciar signos y mortalidad por L.P entre 15 y 18° C y 81 días a 12° C (Kent, 1997).

La relación entre el microsporidio y el virus no está completamente clara, las opiniones generales hacen creer que se trata de dos enfermedades distintas pero muy parecidas. Sin embargo se debe tener en cuenta que algunos agentes no virales e incluso parásitos pueden ser cofactores o promotores de la replicación de retro virus en neoplasias inducidas por virus (Kent, 1997).

El método más común de detección de infecciones masivas de *N. salmonis* es a través de improntas de órganos, que al ser teñidas con Gram, permiten observar estructuras de forma ovoide con un tamaño de 1 x 2 um, uninucleados y Gram positivos. La histología es mucho más sensitiva para detectar formas preesporogónicas dentro del núcleo de hemoblastos en que aparecen como cuerpos esféricos de 2 a 4 um, rodeados por cromatina de la célula huésped (Kent 1997). A la microscopía electrónica se puede apreciar una pared trilaminada, densa y refráctil, que carece de valvas y suturas, en su interior se puede encontrar el esporoplasma ameboide rodeado por un túbulo o filamento polar espiral de 8 a 12 giros sin superposición Chilmonczyk y col., 1991.

Barlough y col. (1995) desarrollaron una técnica de PCR anidado para la detección de *Nucleospora salmonis* de muestras biológicas de salmonídeos, otorgando sensibilidad y especificidad al diagnóstico de esta patología, pudiendo este tipo de examen detectar al parásito en muestras de menos de 10 células infectadas por gramo de muestra (Barlough y col., 1995). Al ser desafiada con otros microsporidios y mixosporidios, solo presentó reacción cruzada con *Nosema necatrix* que es un parásito de insectos y por ello no afectaría esta técnica diagnóstica. Pero usualmente se generan complicaciones para detectar infecciones tempranas o muy suaves, lo que también sucede con peces asintomáticos o portadores (Kent, 1997; Hedrick y col., 1998).

Se ha intentado controlar a este agente con el uso de un derivado de Fumagilina tnp 470, siendo efectivo para prevenir infecciones muy severas pero no logra eliminar al parásito, ya que aún con dosis de 1.0 mg/kg, el 50% de los peces exhibieron infecciones suaves (Higgins y col, 1998).

El aumento de la incidencia de infecciones de *N. salmonis* en *S. salar* en el país y las pérdidas causadas por esta enfermedad, combinado con los últimos reportes que señalan infecciones en otras dos especies marinas en cultivo intensivo, hacen imperativo un mejor entendimiento de la patología y de su



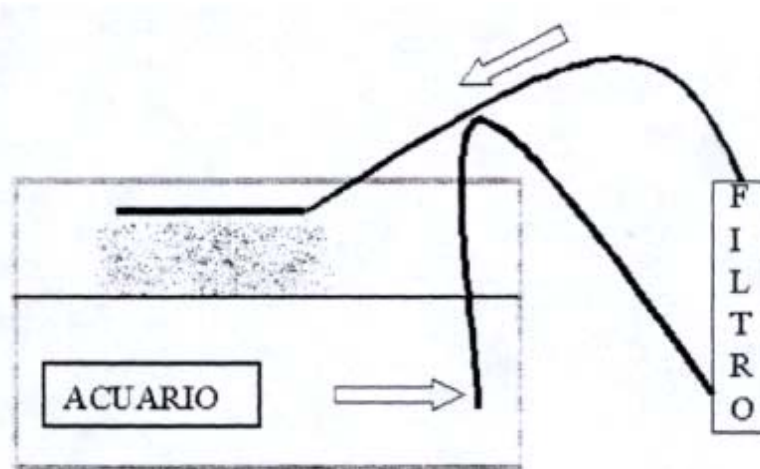
etiología, para así lograr un control adecuado, lo que reduciría las pérdidas económicas que genera esta enfermedad en salmonídeos.

#### 4. MATERIAL Y METODO

Para llevar a cabo este estudio se utilizó la sala de acuarios implementada en las dependencias del laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile. Con el fin de mantener en buena forma a los peces receptores de los inóculos durante el transcurso del estudio y permitir la adecuada eliminación de agua y materiales de desecho que pudieran contaminar los cursos de agua cercanos, se utilizaron 5 acuarios rectangulares de fibra de vidrio con capacidad de 100 litros, equipados con sus respectivos aireadores (Elite, modelo 802) y filtros de agua recirculante (Fluval, 2000) con perlón y carbón activado ( figura N°1).

El agua de los acuarios contenía un 1.8% de salinidad y se obtenía semanalmente de la caleta "Los Molinos" mediante su extracción manual o el uso de motobomba para luego ser transportada en bidones plásticos hasta Valdivia. Esto permitía restituir con agua fresca el volumen perdido mediante la operación semanal de eliminar dos tercios inferiores de agua del acuario, saturado con detritus orgánico.

**Figura 1. Unidad Experimental**



Previo a la eliminación del agua, ésta se desinfectó con cloro comercial al 6% en relación 1:500 y se dejó actuar el producto por espacio de 30 minutos, para luego ser evacuada por el sistema de alcantarillado. Asimismo, todo material biológico se envió al autoclave antes de ser desechado.

#### 4.1. SELECCION Y TRASLADO DE LOS SMOLT

Los peces fueron seleccionados a partir de salmones coho (*Oncorhynchus kisutch*), ubicados en el lago Huillinco (Chiloé). El criterio de selección aplicado correspondió a escoger sólo smolt en buenas condiciones, activos, carentes de deformidades, de jaulas sin problemas sanitarios y con un tamaño entre 40-80g.

Debido a las condiciones de transporte se seleccionó un número mayor al requerido tomando en cuenta posibles mortalidades por estrés, lesiones por manipulación y permitir una selección minuciosa una vez que los peces estuvieran establecidos en la sala de acuarios. El número seleccionado fue de 200 smolt, los que se transportaron en dos estanques plásticos con una capacidad individual de 200 litros utilizando agua del mismo lago y difusión continua de oxígeno hasta su arribo a Valdivia, donde de inmediato se procedió a traspasarlos a los acuarios, que se encontraban funcionando desde dos días antes, para así asegurar una adecuada oxigenación.

Al día siguiente se procedió a retirar todo pez muerto o moribundo y a evaluar el estado total del grupo, manteniéndolos en ayuno forzado por dos días para evitar mayores alteraciones metabólicas debidas al estrés del transpone y al cambio de salinidad. El proceso de alimentación se inició de forma paulatina, ya que en el lugar de origen fueron sometidos a un periodo de ayuno de 5 días. Esta complicación originó que los primeros peces comenzaran a demostrar interés por el alimento recién una semana posterior al traslado, con ello se limitó la alimentación inicial a una dieta comercial de sólo el 0.25% del peso corporal lo cual se fue incrementando con el tiempo, hasta el 1.5% de alimento con respecto al peso corporal.

Durante toda su permanencia, los peces se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo controlado con luz continua de 24 horas.

La selección final se realizó 5 días previo a la inoculación, se eligieron 125 peces, incluyendo sólo los más adaptados y con mejor condición corporal. A una muestra de 10 peces se les practicó necropsia, exámenes bacteriológicos, Elisa/BKD, IFAT/SRS y examen virológico, a fin de evaluar el estado sanitario de los receptores.

Estos fueron distribuidos en cinco acuarios formando grupos al azar de 25 peces a una densidad de 15 Kg/m<sup>3</sup>.

#### 4.1.1. Diseño de los grupos experimentales

Los grupos experimentales se diseñaron según el tipo de inóculo al cual posteriormente serían expuestos, esto a fin de determinar el o los cuadros clínicos que podrían generar la filtración de los Sobrenadante de órganos (ver tabla N°I).

**Tabla N°I: Grupos experimentales**

Unidad	Inoculación Intraperitoneal
Grupo I	0,1 ml de Sobrenadante crudo de órgano
Grupo II	0,1 ml de Sobrenadante filtrado poro 1,2 um
Grupo III	0,1 ml de Sobrenadante filtrado poro 0,2 um
Grupo IV	0,1 ml de suspensión de linfocitos
Grupo control	0,1 ml de MEM-5

#### 4.2. OBTENCION DE PECES ENFERMOS DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA Y ELABORACION DE LOS INOCULOS

El muestreo de peces para elaborar los inóculos se realizó en una empresa salmonera en la zona de Challahue, provincia de Calbuco, de la cual se seleccionaron salmones del atlántico (*S. salar*) en fase de mar (3 kg de peso) con cuadro clínico de L.L. El criterio adoptado para ello fue elegir peces de natación errática, emaciados, con exoftalmia bilateral, branquias pálidas y hemorragias equimótico-petequiales en abdomen. Bajo estas condiciones se seleccionaron 10 peces vivos los que se mantuvieron con difusión continua de oxígeno y se transportaron en dos bidones plásticos cada uno con 200 litros de agua del mismo fiordo, hasta Valdivia.

De los peces transportados llegaron 6 en buenas condiciones, 3 moribundos y uno muerto. Los 6 que presentaban mejores condiciones se traspasaron a acuarios con agua salada que se encontraban en funcionamiento desde el día anterior, asegurando una buena oxigenación.

A los 3 individuos moribundos y al pez muerto, se les practicó exámenes de laboratorio y necropsia a fin de seleccionar sólo peces positivos a Leucemia Linfoblástica. Al día siguiente se realizó el mismo procedimiento con los 6 peces restantes.

Los exámenes de laboratorio incluyeron obtención de muestras de sangre heparinizada para determinar variaciones hematológicas de las que se evaluaron VGA (microhematocrito), recuento total y diferencial de leucocitos y frotis de

sangre (Giemsa). En la necropsia se practicaron improntas de hígado, bazo, riñón y cerebro las que fueron teñidas con Gram.

El resultado de las pruebas confirmó la presencia del parásito *N. salmonis* en dos de los 10 peces en hígado, bazo, riñón y cerebro, acompañado de marcada anemia y leucemia leucémica. De estos dos peces se extrajo muestras estériles de cerebro, ojo y riñón en MEM-5 y sangre heparinizada.

La elaboración de los inóculos comprendió dos grupos, uno elaborado en base a homogenado de órganos y el otro a partir de linfocitos.

#### 4.2.1. Inóculos en base a sobrenadante de órganos.

De los dos peces enfermos de Leucemia Linfoblástica se obtuvieron muestras de cerebro, bazo, ojo y riñón. Estas se depositaron en MEM-5 en una relación 1:4 para obtener una dilución adecuada y posteriormente se maceró utilizando un mortero y arena de río estéril, trabajando bajo cámara de flujo laminar. De este procedimiento se obtuvo el primer inóculo.

##### *SOBRENADANTE CRUDO:*

Puede contener células, restos celulares, microsporidios y virus.

##### *SOBRENADANTE FILTRADO PORO 1.2 um:*

Se elabora en base al anterior, haciendo un pasaje por filtro de poro 1.2um. Este contendría restos celulares, microsporidios y virus.

##### *SOBRENADANTE FILTRADO PORO 0.2um :*

Se obtiene de la filtración del anterior preparado en filtro 0.2um, y puede contener partículas virales y solutos.

#### 4.2.2. Inóculo de linfocitos.

Su componente principal corresponde a células mononucleadas siendo los linfocitos y linfoblastos las células más numerosas, su procedencia es de dos grupos distintos, uno proviene de la centrifugación de sangre de un pez con manifiesta Leucemia Linfoblástica y el otro grupo pertenece a los aislados de bazo y riñón anterior de los mismos peces positivos.

**4.2.2.1 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica por gradiente de Histopaque.** De los *S. salar* aún vivos y previamente anestesiados, se obtuvo sangre heparinizada y se realizó el siguiente procedimiento:

1. Centrifugación de la sangre a 7g por 10 minutos a 15°C.
2. Con pipeta Pasteur se aspiró el tercio superior del volumen de células y se diluyó con MEM-5 (Medio esencial mínimo 460ml; Penicilina- Estreptomicina 10ml; Suero fetal bovino 25ml; L-Glutamina 5ml) a 1/4(v/v).
3. Se adiciono 3ml de sangre diluida en un tubo de poliestireno con 3ml de Histopaque (1077 SIGMA) y se centrifugó a 213g por 30 minutos a 18°C.
4. Luego se extrajo la interfase que contiene en su mayoría linfocitos, mezclando la suspensión de células con dos volúmenes de MEM-5 y centrifugando a 7g por 10 minutos a 18°C.
5. Repitiendo dos veces el paso anterior con resuspensión y centrifugación.
6. Se realizó un conteo celular y se determinó la viabilidad de éstas.
7. La densidad se ajustó a  $5 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo (SL-1).

Este procedimiento permitió obtener  $0,8-3 \times 10^6$  células por ml de sangre heparinizada obtenida por punción caudal, con un mínimo de 95% de linfocitos (Wongtavatchai y col., 1995).

**4.2.2.2 Aislamiento de linfocitos de tejido renal y esplénico.** Durante la necropsia se extrajo muestras de bazo y riñón que se depositaron en MEM-5 y se incubaron a 4°C por 24 hrs, para más tarde continuar con los siguientes pasos:

1. Se preparó una suspensión celular de cada tejido usando una gradilla para tejido Ten Broeck y luego fue diluido con 5 ml de MEM-5 por 0.1 g. de tejido.
2. Los fragmentos de tejidos se dejaron sedimentar en hielo por dos minutos.
3. Se extrajo el sobrenadante celular y se repitieron los pasos 3-6 del procedimiento anterior.

Siguiendo este protocolo se obtuvieron aproximadamente  $2-5 \times 10^7$  células/g de tejido renal y  $3-10 \times 10^7$  células/g de tejido esplénico (Wongtavatchai y col., 1995).

### **4.3. INOCULACION EXPERIMENTAL**

El proceso comenzó con un ayuno de 24 hrs para luego continuar con el procedimiento.

Se llenaron bidones de 75 l con agua salada y flujo continuo de oxígeno, más anestésico BZ-20 Veterquímica (Etil p-aminobenzoato 20g/100ml) en una concentración de 40 mg/l para luego traspasar los grupos de peces en forma paulatina a estos bidones por un período de 20-30 segundos y con ello lograr una anestesia grado 1.

Posteriormente se tomó a los peces uno a uno y se depositaron sobre una superficie de plumavit (poliestireno), se sujetaron con guantes de algodón y se localizó el lugar de punción en la línea media ventral entre la base de las aletas pectorales y las aletas pélvicas, para luego inocular intraperitonealmente.

#### **4.3.1. Mantención de los peces inoculados.**

Todos los peces se mantuvieron en los acuarios asignados para cada grupo experimental, con cambios periódicos de agua salada mantenida con filtros externos activos y bombas de aireación. La alimentación diaria correspondió al 1.5% de su peso corporal, en un ambiente de luz permanente y verificaciones diarias de la temperatura. Cada grupo contó con utensilios individuales a fin de evitar cualquier contacto entre ellos.

#### **4.3.2. Muestreos de peces inoculados.**

La obtención de peces por grupo una vez inoculados se realizó por recolección diaria de peces moribundos o recién muertos, realizando el mismo plan de exámenes para todos los grupos.

### **4.4. NECROPSIA**

Una vez extraídos los peces desde el acuario si éstos aún se encontraban vivos, se sacrificaron mediante denervación por corte con tijeras de la columna vertebral por detrás de la cabeza, y luego se siguieron las técnicas de necropsia descrita en el Fish Health Blue Book (1979).

La primera prioridad fue obtener muestra de sangre antes de que ésta coagule dentro del pez, para lo cual se puncionó la arteria caudal o se obtuvo por corte del pedúnculo caudal.

Luego se realizó un examen externo anotando en un protocolo cualquier alteración dando énfasis al estado de piel, aletas, ojos, nutrición, branquias y opérculo. Una vez finalizado este examen, se desarrolló el examen interno, requiriendo para su realización las siguientes modificaciones de la técnica de necropsia descrita por Fish Health Blue Book (1979).

- Corte de aleta pectoral izquierda por la base mediante el uso de tijeras.
- Introducción de la punta de tijera por la base de aleta, cortando ventralmente hasta línea media siguiendo el curso de ésta hasta poco antes del poro anal, para luego dirigirse dorsocranealmente apegado a la columna y posteriormente descender por detrás de las branquias.

Al despejar la pared ventrolateralmente se pueden apreciar todos los órganos internos y evaluar el estado de hígado, bazo y riñón, anotando todo tipo de alteraciones. De estos órganos se tomaron tres tipos de muestras:

1. De aproximadamente 5mm cúbicos de superficie para realizar improntas.
2. Para histopatología, con un volumen de 1 cm cúbico, que se depositó en frascos con una solución de una parte de formalina precipitada al 37% y nueve partes de agua destilada, las que posteriormente fueron enviadas al laboratorio de Anatomía Patológica de la Universidad Austral de Chile para su análisis.
3. Para microscopía electrónica se obtuvieron muestras de no más de 1 mm cúbico las que se depositaron en frascos con solución de glutaraldehído 2,5%. De éstas se seleccionó una muestra por grupo para ser enviada al Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile.

Las improntas se realizaron con las muestras ligeramente secadas por toalla de papel durante el proceso de necropsia, luego se tomaron con pinza para realizar suaves impresiones sobre portaobjetos, luego de secarse a temperatura ambiente se fijó al calor y se empleó la tinción de Gram.

Las improntas de los cinco grupos fueron observadas bajo microscopía óptica, usando todos los aumentos, siendo de utilidad los dos mayores para diagnosticar la presencia de esporas y describir las características celulares de los tejidos.



## **4.5. VARIACIONES HEMATOLOGICAS**

Se utilizaron dos tipos de muestras, con y sin anticoagulante, para evaluar en todos los grupos como fuera posible sus variaciones hematológicas, no pudiendo realizarse en peces muertos o muy anémicos en los cuales se debió optar por una de las dos muestras.

### **4.5.1. Volumen globular aglomerado (VGA).**

La determinación del hematocrito se realizó con muestras de sangre vertida en tubos de microhematocrito con heparina y sellados con plasticina de alta densidad. Luego se centrifugaron a 12.000 rpm por 5 minutos y se midió el porcentaje de glóbulos rojos y blancos en relación con la muestra, si presentaba una capa flogística gruesa entonces se hacían frotis de ella. Siempre se tomó como prioridad la extracción de sangre para frotis, por lo que no a todos los peces se les evaluó el hematocrito.

### **4.5.2. Frotis de sangre (Giemsa).**

Antes de realizar la necropsia se depositó una gota de sangre sobre un portaobjeto y se extendió con la ayuda de otro, manteniendo una inclinación de 45 grados. Se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó 5 minutos en metanol, luego se procedió a teñir con Giemsa. Este procedimiento también se llevó a cabo con los tubos de microhematocrito que arrojaron una capa flogística con un grosor superior a 1%.

La observación de los frotis se realizó mediante microscopía óptica usando los aumentos menores para apreciar la distribución parcial de las líneas celulares que la componen, y los mayores para ver las características celulares particulares (Blüm y col., 1989) y detectar la presencia de microsporidios en cada muestra.

## 5. RESULTADOS

Durante el transcurso de los primeros cuatro días post-inoculación (P.I.) todos los grupos presentaron decaimiento general, anorexia y natación errática, afectando principalmente a los peces inoculados con homogenados de órganos. No se consideran en el estudio de la mortalidad 1 pez de los grupos H.crudo y Linfocitos por haber muerto dentro de las primeras horas post-inoculación. El número total para estos grupos es de 24 peces inoculados.

Luego de dos semanas P.I. todos los grupos se comportaron de forma similar, con natación normal, pero con escaso apetito.

**Tabla N°2: Mortalidad asociados a Leucemia Linfoblástica (L.L).en s. coho inoculados con preparados de órganos de s. atlántico enfermos de L.L.**

GRUPO	Microsporo-ridios	Leuce-mia	Linfo-blastosi-s	Leucemi-a y Microsp-oridios	Linfoblas-tosis y Microspo-ridios	Total	Negativo-s
S. Crudo	1	0	0	2	5	8	16
S.F.1.2um	9	1	5	0	2	11	14
S.F.0.2um	0	4	11	0	0	15	10
Linfocitos	3	1	6	2	4	16	8
Total	6	6	24	4	10		

En esta tabla se presentan las condiciones hematológicas detectadas en frotis teñidos con Giemsa y los resultados de las improntas teñidas con Gram que permiten diferenciar la mortalidad asociada a L.L.

### 5.1 MORTALIDADES

Se clasificó como peces muertos por causa de "Leucemia Linfoblástica" (L.L.) a todos los peces que al examen clínico presentaron anemia, esplenomegalia, renomegalia y que se acompañaron de una de las condiciones señaladas en la tabla N°2.

### 5.1.1. Grupo I (Sobrenadante Crudo)

Este grupo presentó el primer pez con signología de **L.L.** a los 45 días P.I. Posteriormente a los 48 días P.I. se diagnosticó el primer pez positivo a Microsporidiosis.

Desde la aparición de las primeras mortalidades atribuibles a **L.L.** presentaron en su gran mayoría hemorragias petequiales y equimóticas en abdomen y base de las aletas pectorales así como en cornea además de letargia generalizada. Tres peces mostraron exoftalmia bilateral (tabla N°3).

Por concepto de **L.L.** se registraron 8 peces muertos como se observa en la tabla N°2.

Internamente se caracterizó por esplenomegalia muy marcada y riñón aumentado de volumen, haciéndose notorio en la cabeza y cuerpo más que en la cola de este órgano, palidez hepática y ascitis se presentó en cuatro casos (tabla N°4).

Los exámenes de laboratorio indicaron un hematocrito en general menor a 25% y una capa flogística variable desde 0-2%. Al examen de microscopía óptica, en los frotis de sangre teñidos con Giemsa se detectaron células sanguíneas inmaduras, esporas de **N. salmonis** libres e intranucleares en 7 peces, acompañado de linfoblastosis en cinco casos (foto N°3) y leucemia leucémica en dos de ellos (tabla N°5).

En la observación microscópica de los imprinting se detectó abundante melanina en hígado, bazo y riñón, así como esporas de **N. salmonis** libres e intranucleares, las cuales no siempre resultaron teñirse Gram positivas presentándose esporádicamente incoloras, contrastando con el fondo Gram negativo del núcleo (foto N°1). Las esporas presentaron variaciones de tamaño así como de morfología y forma de tinción, siendo corriente encontrar dos cuerpos polares notorios de marcado color Gram positivo dentro de una formación similar a un grano de arroz, mientras otras presentaban formas ovaladas de mayor tamaño acompañadas de un cuerpo central marcadamente Gram positivo el que podía ser muy pequeño o abarcar casi la totalidad de **N. salmonis**. Los tres órganos denotaron la presencia de células de gran tamaño, de citoplasma escaso con núcleo basófilo muy aumentado de volumen en bazo y riñón.

### 5.1.2 Grupo II (S.F. 1.2um)

El día 34 P.I. se detectó el primer pez con signología atribuible a **L.L.** y a los 39 días P.I. se realizó el primer diagnóstico de Microsporidiosis.

Este grupo presentó letargia general y bajo consumo de alimento, cuatro peces con hemorragias petequiales abdominales y en base de las aletas pectorales, dos de ellos acompañados con exoftalmia bilateral (tabla N°3).

Por causas asociadas a L.L. murieron 11 peces lo que se documenta en la tabla N°2.

A la necropsia se detectó siete peces con riñones notoriamente aumentados de volumen especialmente en cabeza y cuerpo, seis de ellos acompañados con bazo aumentado de volumen y cuatro con ascitis (tabla N°4).

Los exámenes sanguíneos determinaron en promedio un hematocrito menor a 35% acompañado de una capa flogística de 0-2%, encontrándose siete peces con linfoblastosis y dos de ellos con abundantes células inmaduras y algunas esporas libres (tabla N°5).

Las improntas de hígado, bazo y riñón mostraron abundante melanina y células melanomacrofágicas, destacándose tres peces con células de gran tamaño, escaso citoplasma y núcleo marcadamente basófilo en bazo y riñón, acompañándose uno de ellos con esporas de *N. salmonis* en las improntas de riñón, siendo ellas de ubicación extracelular .

### 5.1.3 Grupo III (S.F. 0.2um)

Este grupo presentó a los 34 días P.I. los dos primeros peces muertos con signología de L.L.

Este grupo presentó mortalidad esporádica (tabla N°3). En general los peces se encontraron letárgicos, emaciados y en forma frecuente con hemorragias en la base de las aletas pectorales, dos de estos peces mostraron exoftalmia bilateral leve.

Durante el estudio murieron 15 peces por causas asociadas a L.L. (tabla N°2).

Internamente se caracterizó por una hiperplasia de los órganos hematopoyéticos siendo notorio a la necropsia una acentuada esplenomegalia en ocho peces e hiperplasia renal en sólo seis de ellos (tabla N°4).

Las constantes hematológicas mostraron que todos los peces presentaban un hematocrito inferior al 35% con una capa flogística que varió desde 0 a 3%.

Los frotis de sangre evidenciaron una anemia de tipo regenerativa y acompañada generalmente de linfoblastosis, leucocitosis y en 4 casos leucemia leucémica (tabla N°5).

La observación de las impresiones de órganos a la tinción de Gram destacó la presencia de células de aspecto neoplásico en bazo y riñón de cuatro peces en que estas se encontraban con núcleos basófilos, aumentado de tamaño y citoplasma irregular y escaso.

#### **5.1.4. Grupo IV (Linfocitos)**

El día 38 P.I. murió el primer pez con signos de L.L, éste además resultó ser positivo a Microsporidiosis.

Presentó en general hemorragias petequiales y equimóticas en base de aletas pectorales, abdomen y en menor grado a nivel de ojo. Los peces se presentaban muy emaciados con branquias pálidas y en cinco casos se acompañó de exoftalmia bilateral leve (tabla N°3).

Este grupo alcanzó una mortalidad acumulada de 16 peces atribuible a L.L. durante el tiempo de estudio (tabla N°2).

Internamente presentaban bazo y riñón aumentado de volumen y muy friable llegando ambos a ser de aspecto tumoral en 9 peces. También se detectó ascitis de tipo serosa en tres individuos (tabla N°4).

En general presentaron un hematocrito siempre inferior al 30% con una capa flogística que variaba desde 1-3%.

Los frotis de sangre mostraron en general linfoblastosis y/o leucocitosis, se detectaron tres peces con leucemia leucémica. Cinco ejemplares presentaron cuerpos de inclusión intranuclear correspondientes a microsporidios dentro de linfocitos o linfoblastos, cuatro de ellos con esporas libres. Cabe destacar que la aparición de microsporidios siempre estuvo asociada a un aumento en el número de linfocitos o linfoblastos (tabla N°5).

En las impresiones de órganos teñidas con Gram se destacó la abundancia de melanina, presentando ocho peces células de gran tamaño con núcleos muy pigmentados y de gran volumen en bazo y especialmente en riñón. Además estos individuos presentaron esporas intranucleares en alta concentración, tanto en bazo como riñón (foto N°2). En este grupo se detectaron esporas a nivel del bazo.

#### **5.1.5 Grupo V (Control)**

No registró mortalidades ni cambios conductuales en el periodo de estudio.

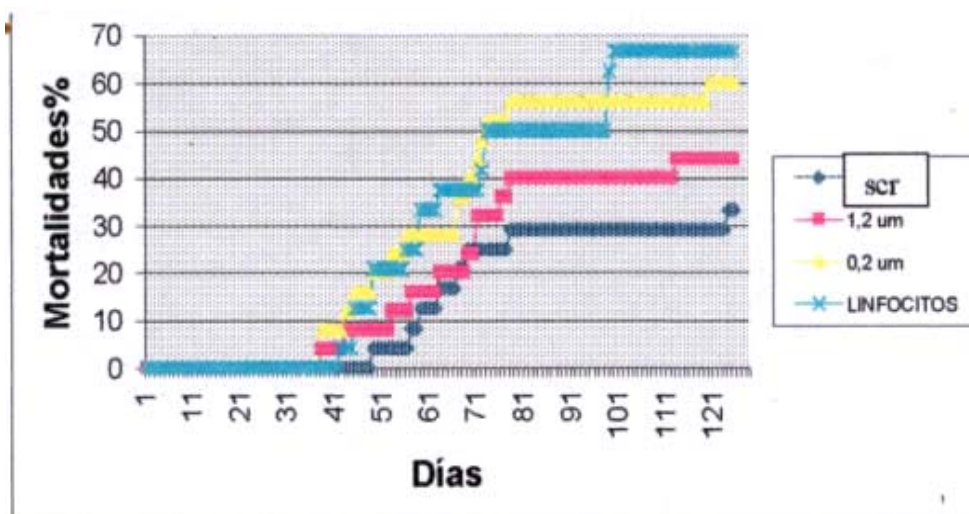
Este fue el único grupo en que los peces presentaron condiciones aparentemente normales, donde en general aumentaron de peso y tamaño, con un comportamiento mas bien activo.

Internamente los órganos se mostraron dentro de las características de la especie.

Los estudios hematológicos revelaron una población pareja en donde los extremos correspondieron a casos aislados, los hematocritos variaron entre 25-45% agrupándose por lo general entre 30-42%.

Las impresiones de órganos presentaron escasa melanina a la tinción de Gram.

**Gráfico N°1: Mortalidades diarias acumuladas asociadas a Leucemia Linfoblástica de los grupos de s. coho inoculados con preparados de órganos de s. atlántico enfermos de L.L.**



## 5.2 HALLAZGOS AL EXAMEN CLINICO

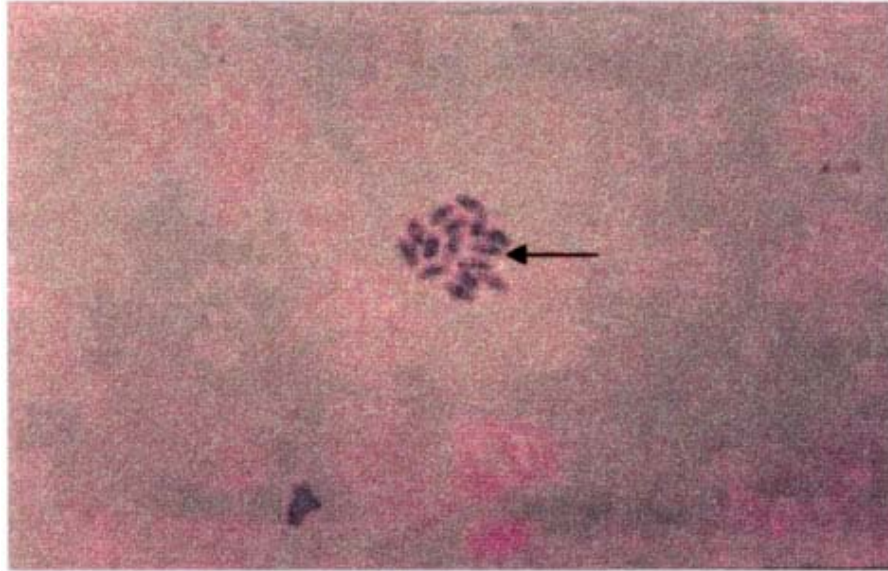
Tabla N°3: Distribución porcentual de los principales hallazgos externos encontrados en s. coho inoculados con preparados de órganos de s. atlántico enfermos de L.L.

	SCR		S.F. 1.2um		S.F. 0.2 u m		Linfocitos	
	N=24		N=25		N=25		N=24	
LESIONES EXTERNAS	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Exoftalmia bilateral	3	12	2	8	2	8	5	20
Petequias en piel	15	60	4	16	16	64	17	68
Palidez branquial	12	48	7	28	8	32	15	60
Piel oscura	4	16	3	12	4	16	8	32

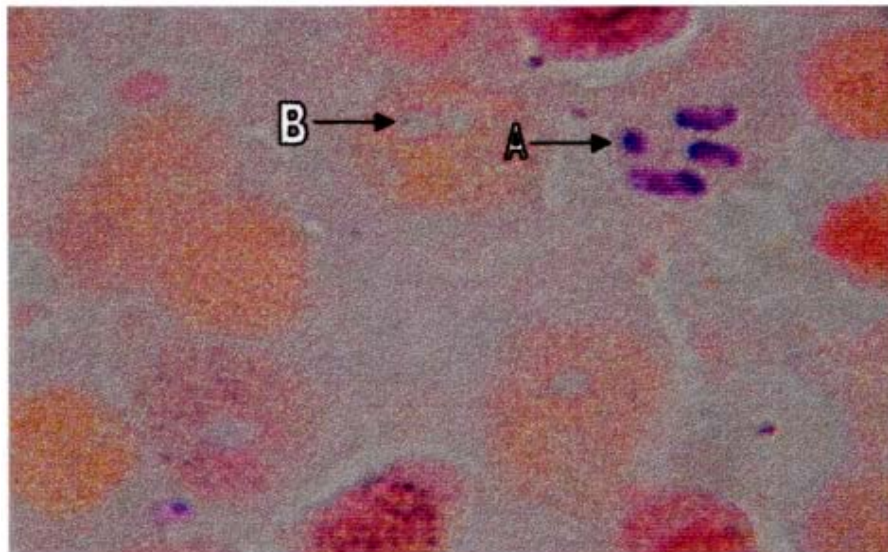
Tabla N°4: Hallazgos internos y presencia de *N. salmonis* a la tinción de Gram en hígado, bazo y riñón de s. Coho inoculados con preparados de órganos de s. atlántico enfermos de L.L.

	Sobrenadante		S.F. 1.2um		S.F. 0.2 um		Linfocitos	
	N=24		N=25		N=25		N=24	
LESIONES INTERNAS	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Palidez hepática	4	16.6	3	12	5	20	7	29.2
Esplenomegalia	9	37.5	6	24	8	32	9	37.5
Renomegalia	8	33.3	7	28	6	24	9	37.5
Intestino congestivo	9	37.5	3	12	8	32	12	50
Ascitis	4	16.6	4	16	1	4	3	12.5
Esporas Gram+	6	25	1	4	0	0	8	33.3

Internamente se observaron alteraciones de los órganos hematopoyéticos y procesos inflamatorios generalizados, los que se detectaron frecuentemente en los diversos grupos, sin embargo la esplenomegalia y renomegalia son los signos más comunes de encontrar en todos los grupos experimentales



**Fotografía N° 1: Impronta de riñón de s. coho inoculado con sobrenadante de órganos de s. atlántico enfermos de L.L que muestra un cúmulo de esporas de *N. salmonis* Gram positivas en una célula en proceso de lisis (1000X)**



**Fotografía N° 2: Impronta de riñón de s. coho inoculado con preparado de linfocitos de s. atlántico enfermos de L.L que muestra A) esporas Gram positivas y B) esporas no teñidas de *N. salmonis* (1000X).**



**Tabla N° 5: Resultados obtenidos al realizar el análisis hematológico de los s. Coho inoculados con preparados de órganos de s. atlántico enfermos de L.L.**

OBSERVACIONES	SCR		S.F. 1.2um		S.F. 0.2um		Linfocitos	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Hematocrito <30%	24	100	16	64	21	84	24	91.6
Capa flogística >1%	9	37.5	3	12	7	24	23	95.8
Células inmaduras	4	16.6	2	8	1	4	2	8.3
Linfoblastosis	5	20.8	7	28	44	28	10	41.6
Leucemia	2	8.3	1	4	4	16	3	12.5
Esporas en sangre	7	29.2	2	8	0	0	5	20.8

Como se aprecia en la tabla N°5, los hallazgos que primaron en los diferentes grupos fueron: marcada anemia general, capa flogística frecuentemente elevada y una significativa linfoblastosis.



**Fotografía N°3: Frotis de sangre de s. coho inoculado con preparados de órganos de s. atlántico enfermos de L.L. teñido con Giemsa que muestra linfoblastos con cuerpos de inclusión intranucleares (1200X).**

### **5.3 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO Y DE MICROSCOPIA ELECTRONICA.**

El estudio histopatológico fue realizado en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Instituto de Patología Animal y el examen de microscopía electrónica de transmisión fue llevado a cabo en el Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile, donde se realizó la inclusión y cortes, y de manera conjunta la observación de éstas. Ambos estudios se basaron en el envío de muestras de bazo y riñón de un pez de cada grupo inoculado.

#### **5.3.1 Grupo I (Sobrenadante Crudo)**

La descripción histopatológica señala en bazo un leve aumento del número de células melanomacrofágicas, observándose en forma difusa leve hiperplasia de células hematopoyéticas. Mientras el riñón se presentó con un moderado incremento multifocal de melanomacrófagos y una leve pérdida de cohesión del tejido hematopoyético, con áreas focales donde se observó moderada hiperplasia de células hematopoyéticas.

El examen de microscopía electrónica evidenció la presencia de esporas intranucleares ovoides con esporoplasma amebode, que en su interior contenía un túbulo helicoidal y un cuerpo polar prominente (foto N°4).

#### **5.3.2 Grupo II (S.F. 1.2)**

El análisis de los cortes de riñón reveló un moderado aumento de células melanomacrofágicas acompañado de vacuolización citoplasmática difusa en algunos epitelios tubulares. En bazo, el parénquima evidenció en forma difusa algunas células grandes de citoplasma denso, núcleo grande y de leve pleomorfismo, el tejido presentó algunos melanomacrófagos y leve hemosiderosis. Estos hallazgos hacen sospechar al patólogo de un cuadro inicial de leucemia.

Las fotos de microscopía electrónica mostraron microsporidios sólo en riñón, pero en bazo se detectó la presencia de estructuras al parecer proteicas de forma hexagonal con un core denso muy similar a los retrovirus asociados a la Leucemia Plasmacitoidea (foto N°5).

### **5.3.2 Grupo III (S.F. 0.2)**

De la observación histológica de riñón se describe moderada hiperplasia multifocal de melanomacrófagos y del tejido hematopoyético, cuyas células presentaron moderado pleomorfismo nuclear y pérdida de cohesión intercelular. Los glomérulos se presentaron tumefactos y con abundante material proteico en el espacio de Bowman, y que también se aprecia en el lumen de algunos túbulos. Los epitelios tubulares evidenciaron moderados trastornos vacuolares. El riñón presentó un moderado número de células poliédricas, con citoplasma denso y núcleo pleomórfico, acompañado de numerosas figuras mitóticas. El diagnóstico para esta muestra señala leucemia linfoblástica renal y esplénica.

El uso de microscopía electrónica reveló abundante cantidad de melanina libre y restos proteicos citoplasmáticos.

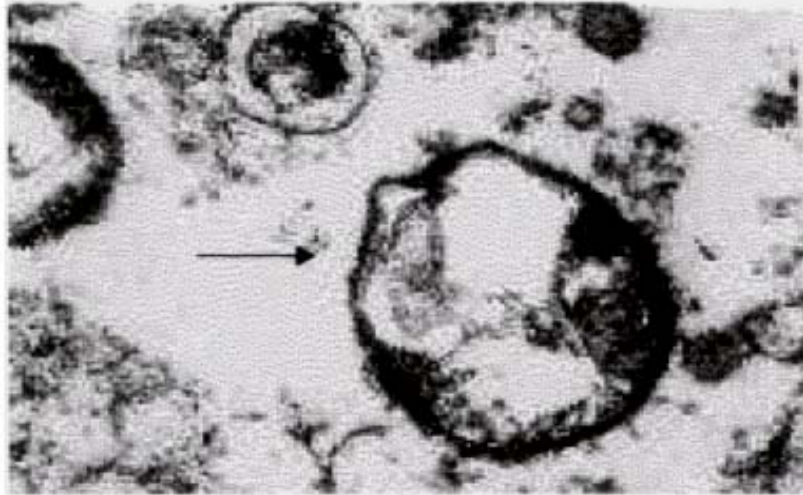
### **5.3.3 Grupo IV (Linfocitos)**

La descripción histopatológica señala para riñón una marcada hiperplasia de melanomacrófagos acompañada de pérdida de cohesión de las células hematopoyéticas, las cuales se observaron muy redondas, de diámetro variable, con un citoplasma de mediana basofilia y núcleos de marcado pleomorfismo. Los epitelios tubulares presentan trastornos vacuolares, con signos de necrosis en algunos casos. El diagnóstico para esta muestra señala leucemia linfoblástica renal.

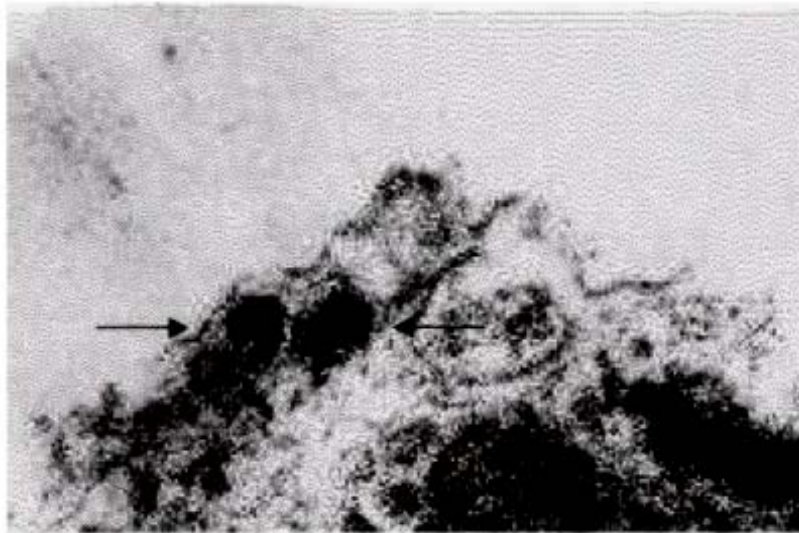
La observación por microscopía electrónica mostró la presencia de esporas intranucleares y abundante melania.

### **5.3.4 Grupo Control**

Los exámenes anteriormente realizados no mostraron mayores trastornos ya que se encontraban dentro de los parámetros normales para peces de cultivo intensivo.



**Fotografía N°4: Foto de riñón de s. coho grupo SCR, tomada desde microscopio electrónico con 20.000X. Muestra una espora de *Nucleospora salmonis* seccionada.**



**Fotografía N°5: Foto de bazo de s. coho grupo S.F 1.2, tomada desde microscopio electrónico con 20.000X. Muestra dos estructuras hexagonales con un núcleo denso de aspecto similar a partículas retrovirus-like.**

## 6. DISCUSION

Al observar las curvas de mortalidad de los grupos de s. coho en estudio se puede determinar el carácter infecto contagioso de los cuatro tipos diferentes de inóculos originados de sobrenadante de órganos de s. atlántico enfermos de Leucemia Linfoblástica (L.L.). Los salmones coho inoculados presentaron un elevado porcentaje de mortalidad con signología clínica que se asemeja a lo descrito para esta enfermedad (Suarez, 1997; Soto, 1997).

Los salmones coho inoculados con sobrenadante crudo (SCR) de s. atlántico presentaron mortalidades desde el día 45 hasta el día 120 postinoculación (P.I); que se concentró principalmente entre los días 45 y 74 P.I Este resultado se aproxima bastante a lo descrito por Eaton y Kent (1992) para s. chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), quienes señalan que los signos y mortalidades por Leucemia Plasmacitoidea (L.P.) comienzan a los 30 días y se acentúan a los 42 días P.I presentando los peces signología clínica y lesiones histopatológicas de la enfermedad.

A los 48 días P.I se diagnosticó el primer pez con microsporidiosis (*N. Salmonis*) resultado similar a lo obtenido en la Universidad de Davis, Ca, USA. (Kent; 1997) donde a los 53 días P.I se obtuvo mortalidad por este parásito en truchas arcoiris (*O.mykiss*)

La mortalidad acumulada causada por "Leucemia Linfoblástica" en los s. coho inoculados con SCR llegó a un 33.3%. Los peces mostraron una acentuada letargia, pero con escasos signos externos, en contraposición al 10% de mortalidad señalado por Walker (1996) para truchas de cultivo en agua dulce, donde los peces afectados mostraron marcada signología. Además, al comparar con los resultados obtenidos por Newbound y Kent (1991) quienes obtuvieron un 19 % de mortalidad para truchas, se puede argumentar que la diferencia puede estar asociada a las distintas especies de peces inoculados y/o a los diferentes orígenes de los órganos para preparar los inóculos. También se deben considerar las condiciones experimentales como la temperatura del agua, su recirculación y la salinidad de 18% utilizada en este estudio.

El grupo inoculado con Sobrenadante Filtrado 1,2 um (SF 1.2) presentó mortalidades desde el día 34 hasta el día 109 P.I, periodo en el cual se mueren por causas asociadas a la enfermedad 11 peces que corresponde al 44% del total de individuos. Esto se destaca en el gráfico N° 2 donde nuevamente se concentra la mortalidad entre los días 34 -74 P.I produciéndose en este lapso el 90% de la mortalidad total. El día 39 P.L se observa el primer pez con esporas del parásito *Nucleospora salmonis* (N.s.). Notoriamente la mortalidad se mantiene dentro

del 50% esperado para esta patología, según lo destacado por Kent y Dawe (1993).

Para los peces inoculados con Sobrenadante Filtrado 0.2 um (SF 0.2) se detectaron mortalidades desde el día 34 hasta el 116 P.I en que mueren 15 peces, lo que representa el 60% del total de peces inoculados. Nuevamente se concentran las mortalidades entre los días 34 -74 P.I con el 93% de la mortalidad total, como se puede apreciar en el gráfico N°3. Este resultado es superior a la mortalidad obtenida en las inoculaciones de S. Filtrado 0.2 um en s. chinook por Kent y Dawe (1993), donde la mortalidad total llegó sólo a 30% y la primera mortalidad asociada a la enfermedad se detectó a los 45 días **P.I.** La diferencia de resultados principalmente estaría sustentada en la diferencia de condiciones de los experimentos y a la diferencia de susceptibilidad de las especies.

Los peces inoculados con linfocitos aislados de s. salar enfermos de **L.L.** presentaron mortalidades desde el día 38 hasta el 120 P.L con 16 peces, esto es el 66.6% del total de la población inoculada y se concentran las mortalidades entre los días 38-95, como se observa en el gráfico N°4. Estos resultados son menores a los descritos por Antonio y Hedrick (1995) en que aún para temperaturas de agua de 12°C describen una mortalidad acumulada de 73.7% pero su trabajo se extendió por sobre las 20 semanas **P.I**

Todos los grupos experimentales expuestos a los inóculos elaborados en base a **S. salar** enfermos de **L.L.** presentaron un periodo de incubación homologable que correspondió a 34-48 días **P.I** y una curva de mortalidad de pendiente similar variando solo en la longitud del periodo de mortalidad.

Clínicamente todos los grupos presentaron signología común y en proporciones similares. Lo más característico para todos los grupos fue según lo muestra la tabla N°3 la presentación de hemorragias petequiales abdominales que se presentaron por sobre el 60% para SCR, S.F 0.2 y Linfocitos, mientras que para S.F 1.2 se presentó en sólo el 28% de los casos. Otro signo significativo fue palidez branquial que tuvo una incidencia siempre superior al 28% en todos los grupos y en menor grado, piel oscura y exoftalmia. En general estos son signos descritos para **L.P.** como lo destaca Kent y Dawe (1993) pero al parecer la exoftalmia bilateral se hace más evidente en ese estudio por tratarse de individuos con una patología más crónica. Sin embargo Eaton y Kent (1992) encontraron peces con severa exoftalmia en un estudio de 6 semanas de duración.

Internamente se presentaron de forma común para todos los grupos esplenomegalia y renomegalia, los que variaron entre un 24% hasta un 37.5%, seguido de un altísimo nivel de congestión intestinal. De manera esporádica se presentó una escasa ascitis serosa y en menor grado se observó palidez hepática. Todas estas alteraciones son descritas para **L.P.** por Kent y Dawe (1993), Walker (1996), Eaton y Kent (1992) y de manera similar en Chile para **L.L.** según Enriquez y col. (1995), Suárez (1997) y Soto (1997).

Los exámenes sanguíneos arrojaron marcadas alteraciones en todos los grupos siendo al parecer éste, el tejido más afectado. Uno de los signos más característicos correspondió a niveles de hematocrito inferiores al 30%. Afectando desde un 64% de los peces inoculados con S.F 1.2 y hasta el 100% para SCR. Esta signología fue descrita para peces de cultivo infectados con el parásito **N.s.** por Elston y col. (1987) y Eaton y Kent (1992). Sin embargo, de forma frecuente esta anemia fue acompañada por un aumento en el porcentaje de la capa flogística la que superó el 1% con respecto al V.G.A. en todos los grupos, llegando a afectar el 92% de los peces en el grupo linfocitos, siendo este un signo de leucocitosis o leucemia.

El análisis de los frotis sanguíneos reveló la presencia de células inmaduras de la línea roja y blanca en todos los grupos, llegando sólo al 4% en S.F. 0.2, 8% S.F. 1.2, 8.3% Linfocitos y 16% en el caso de SCR. mientras que la presentación exclusiva de linfoblastos en sangre circulante ascendió al 20% en SCR, 28% en S.F. 1.2 y S.F.0.2, y 41.6% para el caso de peces inoculados con Linfocitos, la condición de leucemia detectada en los frotis afectó al 8.3 % de la población para SCR, 12.5% para Linfocitos y 16% para el grupo S.F. 0.2 notándose que nuevamente S.F. 1.2 es el grupo menos afectado con solo 4%. Esta condición es similar a la descrita por Chilmonczyk y col. (1991) quienes describen anemia, linfoblastosis y leucemia en s. chinook infectado con **Enterocytozoon salmonis**. Eaton y Kent (1992) en su estudio de Leucemia Plasmacitoídea hacen referencia de esta condición leucémica como un importante signo producido por la presencia del agente S.L.V. (Salmón Leukemia Virus). Como este signo se presentó en los grupos que recibieron inoculaciones de sobrenadante de órganos con y sin filtración, cabe la duda si esta es una condición producida por el parásito o por un agente viral, pues si bien el grupo S.F. 0.2 solamente podría contener virus íntegros (y no **N.s.**), también presentó individuos con condición leucémica detectada en los frotis sanguíneos y en histología de riñón. Sin embargo, surge la hipótesis que **Nucleospora salmonis** puede originar la condición de leucemia por medio de algún factor mitogénico soluble, capaz de pasar el filtro de 0.2 um como lo describe Wongtavatchai y col. (1995). Pero este correspondería a un efecto que se agotaría en el tiempo, cosa que no se produjo en el grupo inoculado con Sobrenadante Filtrado por poro 0.2 um, ya que esta condición se presentó hasta el final del experimento.

Es posible que ambos agentes puedan originar una condición neoplásica acompañada de signos generales muy similares, por otro lado no se descarta que de alguna manera uno u otro sean cofactores mutuos estimulándose entre sí, para favorecer la presentación de un cuadro con mayores complicaciones, ya que los grupos de SCR y linfocitos que son los que por excelencia contienen microsporidios y virus en caso de que éstos existieran, presentaron los mayores porcentajes de individuos (sobre el 91%), con hematocrito menores a 30%, como también capas flogísticas aumentadas, llegando en el grupo de Linfocitos a presentar peces con capa flogística superior al 3%.

En los grupos SCR, S.F 1.2 y Linfocito, se encontraron esporas de **N.s.** circulante de forma libre y dentro de linfocitos de aspecto neoplásico, pero el nivel de infección detectado en el grupo S.F 1.2 fue sorprendentemente menor a los otros dos grupos por lo que se puede argumentar que las esporas de **N.s.** son incapaces de atravesar la filtración de 0.2um y de mala forma logran pasar una filtración de 1.2 um, ésto lo señala Chilmonczyk y col. (1991) al determinar que las esporas de *N.s.* presentan una forma ovoide y poseen un tamaño de 1x2 um.

La realización de improntas de hígado, bazo y riñón mostraron una marcada presencia de células melanomacrofágicas, así como de melanina dispersa. También es destacable que todos los grupos presentaron gran cantidad de células de aspecto neoplásico que se destacaban por ser de gran tamaño con un núcleo de enorme proporción, de coloración muy basófila. Con relativa frecuencia eran este tipo de células las que principalmente presentaron cuerpos de inclusión intranucleares en los grupos de SCR, S.F 1.2 y Linfocitos siendo nuevamente S.F 1.2 el grupo menos afectado, encontrándose tan sólo una muestra positiva, mientras que SCR y Linfocitos presentaron un 25 y 33.3% respectivamente de sus individuos positivos al Gram. Nuevamente esta condición hace pensar que la filtración por 1.2 um afectó de manera considerable la dosis de inoculación por lo que la espora presentaría un tamaño variable y que únicamente las esporas de menor tamaño lograron atravesar el filtro. Los cuerpos de inclusión intranucleares se mostraron de forma y tamaño bastante variado, generalmente Gram positivos lo que correspondía a esporas de **N. salmonis**. Es destacable la peculiaridad con que podía variar la coloración de estas esporas llegando algunas a ser incoloras, así como la forma ovalada podía ser cambiada a esferoidales de gran tamaño, todos estos cambios pudieron ser mediados por el estado de madurez en que se encontraba el parásito, ya que por lo general en un individuo se presentaba primordialmente un sólo tipo de espora, asimismo las esporas libres siempre presentaron una morfología y coloración similar a la descrita previamente por Elston y col. (1987) y Chilmonczyk y col. (1991). De forma general se puede decir que el órgano blanco de este parásito correspondió al riñón, presentándose frecuentemente aumentado de volumen, congestivo y con una muy marcada presencia de esporas, ya que en sólo dos peces se detectaron en bazo, es así como lo destaca Chilmonczyk y col. (1991) en que describen para *s. chinook* de cultivo la infección de **N.s.** afectando principalmente a los linfocitos, células epiteliales de los túbulos urinarios y células glomerulares.

Al examen histopatológico se diagnosticó Leucemia Linfoblástica en 1 pez del grupo S.F 0.2 y otro del grupo Linfocitos, mientras que para S.F 1.2 sólo se sospechó de un cuadro inicial de leucemia, también se detectó pleomorfismo y células de gran tamaño con citoplasma denso y núcleo grande para los grupos S.F 1.2, S.F 0.2 y Linfocitos. Para SCR además se describe una leve hiperplasia de células hematopoyéticas en bazo, y en riñón, en donde se presentó además áreas focales de moderada hiperplasia de células hematopoyéticas, siendo todos éstos, signos comunes para estadios iniciales de leucemia. La condición de leucemia es una de las principales características de la enfermedad producida por



**N.s.** como describe Chilmonczyk y col. (1991) asimismo Eaton y Kent (1992) señalan que la Leucemia Plasmacitoídea ha sido caracterizada como una proliferación e infiltración de plasmoblastos en órganos viscerales, sin embargo la infiltración de células blásticas ocurre en una fase tardía y generalmente terminal de la enfermedad la cual sólo se presentaría como un efecto crónico, es así que Newbound y Kent (1991) describen este signo en peces de más de un kilogramo. Para **L.L.** Cubillos y col. (1995) describen una condición de proliferación de células linfoblásticas en los tejidos.

La observación de las muestras para microscopía electrónica evidenció la presencia de esporas intranucleares en el grupo de SCR., S.F. 1.2 y Linfocitos localizadas en riñón, en que se describen de forma más bien ovoide, con un tamaño aproximado de 2  $\mu\text{m}$ , el esporoplasma se aprecia notoriamente ameboide y en las esporas se visualizó nítidamente un tubo helicoidal de varios giros con un cuerpo polar notorio, lo que concuerda claramente con la descripción de Chilmonczyk y col. (1991) quienes hacen un detalle más exacto señalando que el túbulo helicoidal presenta de ocho a doce giros y que el tamaño de la espora varía entre 1 -2  $\mu\text{m}$ .

La microscopía electrónica de la muestra de bazo del grupo S.F. 1.2, reveló la presencia de estructuras hexagonales en escasas cantidades, al parecer corresponderían a formaciones proteicas las que poseen un core denso, su tamaño bordea los 100 nm de diámetro, su aspecto es muy similar a los retro virus asociados a la Leucemia Plasmacitoídea, concordando con la descripción a la que hace referencia Eaton y Kent (1992) en que además, describen su ubicación cercana a plasmoblastos y rodeado de restos de membranas celulares como se puede apreciar en la foto N°5. No es extraño que un retrovirus estuviera originando un cuadro de leucemia, ya que Eaton y Kent (1992) señalan que estos serían los agentes causales de varias neoplasias de peces y al menos dos afectarían a células sanguíneas, como una leucemia transmisible en *Ictalurus nebulosus*, sarcoma en *S.vitreum* y fibrosarcoma de la vejiga natatoria en *S.salar*. Una prueba adicional aunque indirecta, de gran valor para determinar la presencia de este grupo de virus, es la detección de la enzima Transcriptasa Reversa, la cual no se pudo pesquisar dada la necesidad de usar radioisótopos.

## 7. CONCLUSIONES

- La **Leucemia Linfoblástica** puede ser reproducida en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) mediante la inoculación intraperitoneal de homogenados de órganos de salmón del atlántico (*Salmo salar*) enfermos de **Leucemia Linfoblástica**.
- Los grupos de s. coho (*O. kisutch*) inoculados con homogenados de órganos con y sin filtración presentaron signología clínica inespecífica como: melanosis, hiporexia, palidez branquial, peces orillados, hemorragias petequiales en abdomen y en menor grado exoftalmia bilateral.
- Internamente todos los peces inoculados presentaron intestino congestivo, renomegalia, eplenamegalia, palidez hepática y ascitis.
- El riñón correspondería al órgano blanco de esta enfermedad.
- El parásito microsporidio *Nucleospora salmonis*, fue detectado en los grupos inoculados con, homogenado crudo, homogenado filtrado por poro 1.2 um. y linfocitos de peces con L.L.
- *Nucleospora salmonis* no puede atravesar el filtro de 0.2 um.
- Los signos clínicos y mortalidades originadas por L.L. se presentaron desde el día 34 en adelante presentando curvas de mortalidades de distinta duración pero similar pendiente.
- No todos los peces con cuadro de Leucemia Linfoblástica presentaron *Nucleospora salmonis*
- La filtración por 0.2um no es impedimento para originar un cuadro de L.L., por lo que se sugiere la presencia de un agente viral o algún factor mitogénico soluble.
- Se observaron partículas homologables a virus (virus-like) en bazo de salmón coho inoculados con homogenados filtrados por poro 1.2 um.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ANTONIO, D. B.; R. P. HEDRICK.** 1995. Effect of water temperature on infections with the microsporidian *Enterocytozoon salmonis* in chinook salmon. *Dis. Aquat. Org.* 22: 233-236.
- BARLOUGH, J. E.; T. S. MCDOWELL; A. MILANI; L. BIGORNIA; S. B. SLEMENDA; N. J. PLENIAZCK; R. P. HEDRICK.** 1995 Nested polymerase chain reaction for detection of *Enterocytozoon salmonis* Genomic DNA in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Dis. Aquat. Org.* 23: 17-23.
- BLÜM, V; J. CASADO; J. LEHMANN; E. MEHRING.** 1989 Farbatlas der Histologie der Regenbogenforelle (Springer-Verlag).
- BUSTOS, P.** 1993. Pérdidas por enfermedades bacterianas de salmónidos en Chile. *Aquanoticias internacional* octubre-diciembre. 5 (19): 4-13.
- CAMPOS, M.** 1999. Balance de la acuicultura en 1998: Amaina el temporal. *Aquanoticias internacional* abril-mayo 11 (48): 24-29.
- CUBILLOS, V; E. PAREDES; R. ENRIQUEZ; A.M. CANAL; M. MONRAS and A. ALBERDL** 1995. Histologic evidence of lymphoblastic leukemia in atlantic salmon (*Salmo salar*}, salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in south of Chile. *Abstract book - European association of fish pathologists.* 29.
- CHILMONCZYK, S.; W. COX; R. HEDRICK** 1991 *Enterocytozoon salmonis* N. Sp: An Intranuclear Microsporidium from Salmonid Fish *J. Protozool.* 38 (3): 264-269.
- DOCKER, M. E.; M. L. KENT; D. M. HERVIO; J. S. KHATTRA; L. M. WEISS; A. CALI; R. H. DEVLIN** 1997. Ribosomal DNA sequence of *Nucleospora salmonis* HEDRICK, GROFF and BAXA, 1991 (Microsporea: Enterocytozoonidae): Implications for phylogeny and nomenclature. *J. Euk. Microbiol.* 44 (1): 55-60.
- EALSTON, R. A.; M. L. KENT; L. H. HARRELL.** 1987 An intranuclear microsporidium associated with acute anemia in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. protozool* 34 (3): 274 - 277.

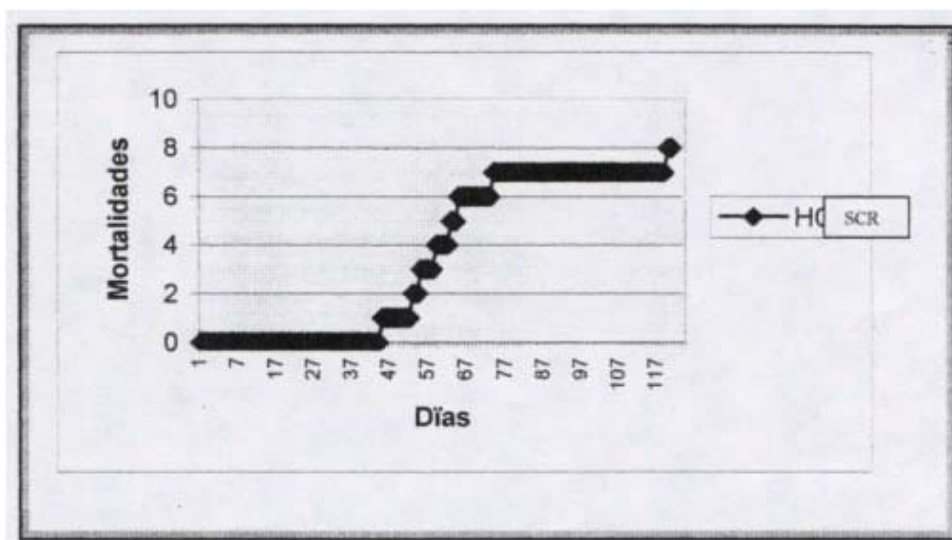
- EATON, W. D.; M .L. KENT, 1992. A retrovirus in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) with plasmacytoid leukemia an evidence for the etiology of the disease. *Cancer res.* 52: 6496-6500.
- ENRIQUEZ, R.; V. CUBILLOS; E. PAREDES; S. LEAL and M. MONRAS. 1995. Leukemia in sea water reared atlantic salmón (*S. salar*) and rainbow trout (*O. mykiss*) in Chile. *Abstract book - European association of fish pathologists.* 30.
- ENRIQUEZ, R.; J. P. NUÑEZ; M. SOTO; D. SUAREZ; M. MONRAS; E. PAREDES; V. CUBILLOS. 1997. Linfoblastic Leukemia and its relations with another diseases of salmon in Southern Chile. *Abstract book - European association of fish pathologists.* P - 058.
- HARDY, R.; E. CASTRO. 1992. La industria Chilena de alimentos para salmones. *Aquanoticias internacional* diciembre. 4 (15): 4-23.
- HEDRICK, R. P.; J. M. GROFF; T. S. McDOWELL; M. WILLIS and W. T. COX. 1990. Hematopoyetic intranuclear microsporidian infections with features of leukemia in Chinook salmón (*O. tshawytscha*). . *Dis. Aquat. Org.* 10:103-108.
- HEDRICK, R. P. ; J. M. GROFF and D. V. BAXA. 1991 Experimental infections with *Enterocitoozon salmonis* (Microsporea: Viral or microsporidian etiology?. *Fish health section - American Fisheries Society Newsletter.* 19: 1-2.
- HEDRICK, R; J. BARLOW.; T. MCDOWELL; S. GRESOVLAC; M.GEORDIAGIS. 1998. *Nucleospora salmonis*. A microsporidean parasite of salmonid fish - development of new diagnostic approach. *In vitro cell. dev.biol-animal* 34:3.
- HIGGINS, M. J.; M. L. KENT; J. D. W. MORAN; M. L. WEISS; S. C. DAWE. 1998. efficacy of the fumagillin analog TNP-470 for *Nucleospora salmonis* and *Loma salmonae* infeccions in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Dis. Aquat. Org.* 34: 45-49.
- 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. and S. C. DAWE. 1993. Further evidence for a viral etiology in plasmocytoid leukemia of chinook salmón (*O. tshawytscha*). *Dis. Aquat. Org.* 15:115-121.

- KENT, M. L.; G. C. NEWBOUND; G. S. TRAXLER; C. STEPHEN; S. C. DAWE; D. KEISER.; ROOME; W. E. EATON and DR. F. MARKAHAM.** 1993. Observations on the transmission and range of plasmocytoid leukemia of chinook salmon (*O. tshawytscha*). *Fish Health Section - American Fisheries Society News letter*. 21:1-3.
- KENT. M.** 1997. Workshop: salmonid microsporidiosis: approach to diagnosis and control. Hotel Vicente Pérez Rosales, organizado por Aquatic Health, Puerto Montt - Chile, noviembre de 1997.
- McDANIEL, D.;** 1979. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish health blue book.
- MENDEZ, R.; L. VIDAL,** 1994. La salmonicultura chilena en 1993 balance de una creciente actividad. *Aquanoticias internacional* enero-marzo. 6. (20): 24-29.
- MILLER, M.** 1996. Newly identified fish disease confirmed in Colorado. *The fishing network - The Colorado Fishing Federation*. 1: 12
- NEWBOUND, G.; M. KENT.** 1991. Experimental interspecies transmission of Plasmacytoid Leukemia in salmonid fishes. *Dis. Aquat. Org.* 10: 159-166.
- ROMERO, F.G.;O.C. MUNITA.** 1994. Perspectivas de mercado de la acuicultura chilena *Aquanoticias internacional*. 6 (22): 6-17
- RONALD, W.H; E. CASTRO.** 1992. La industria chilena de alimentos para salmones. *Aquanoticias internacional* diciembre. 4 (15): 4-23.
- 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.
- 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.
- WALKER, P.** 1996. Parasitic Protozoan DNA Detected at Ennis National Fish Hatchery. U.S. Fish and Wildlife Service, C.D.O.W. press released august 16.

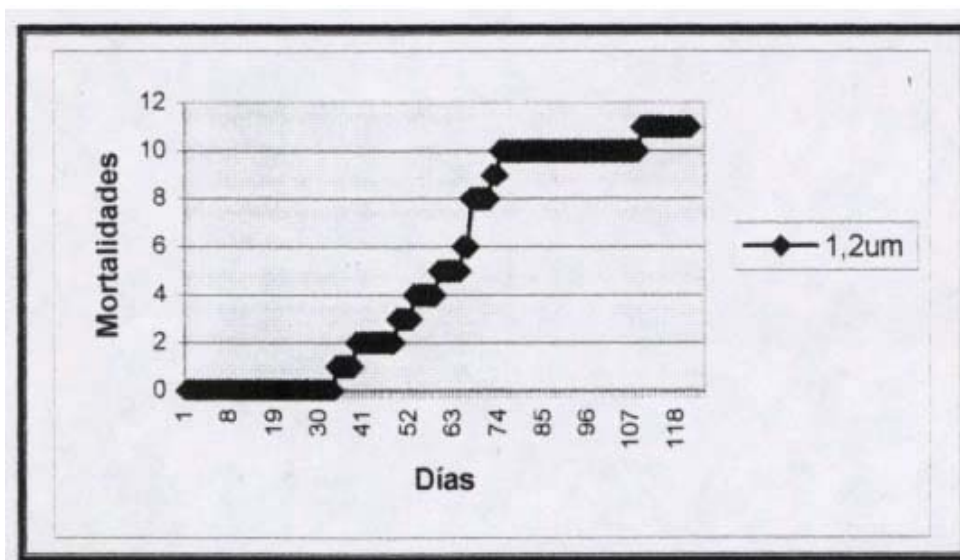
- WITTTWER, F. y H. BÖHMWALD.** 1993. Manual de patología clínica veterinaria. Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia - Chile, pp 167.
- WONGTAVATCHAI, J.; P. CONRAD; R. HEDRICK.** 1993 In vitro cultivations of the Microsporidian: *Enterocytozoon salmonis* using anewly developed media for salmonid lymphocytes. pp 17.
- WONGTAVATCHAI, J.; P. CONRAD; R. HEDRICK** 1995 In vitro Characteristics of the Microsporidean : *Enterocytozoon salmonis*. *J Euk. Microbiol* 42 (4): 401-405.

## ANEXO

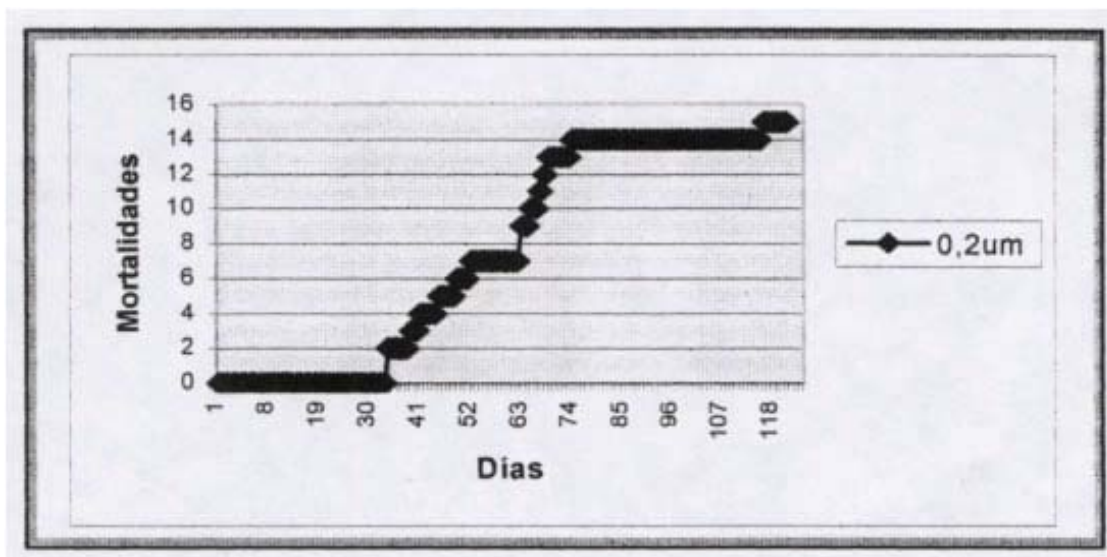
**Gráfico N°2:** Representa la curva de mortalidades diarias acumuladas de s. coho producida por L.L en el grupo inoculado con SCR de s. atlántico naturalmente infectado con L.L.



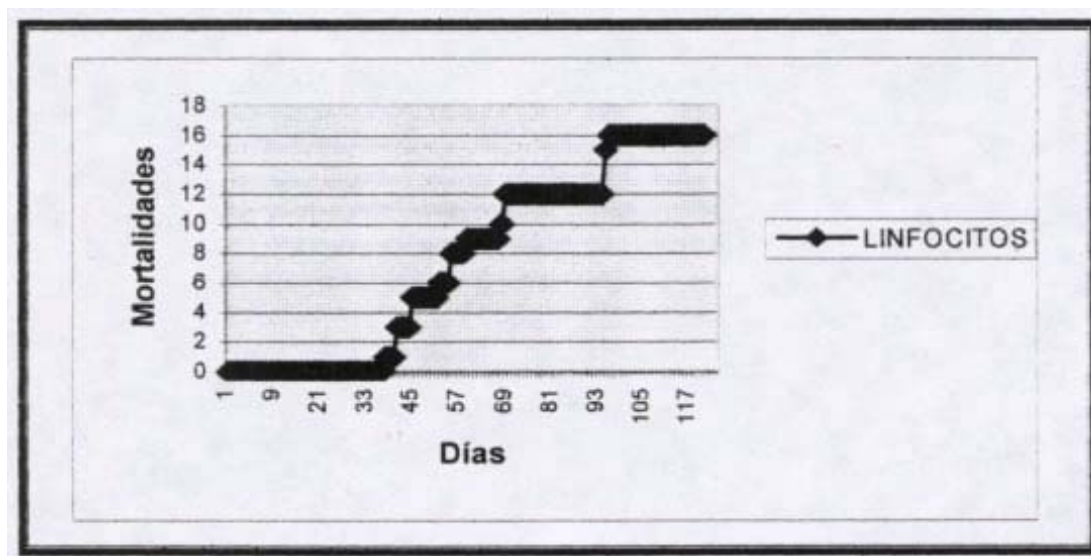
**Gráfico N°3:** Curva de mortalidades diarias acumuladas producidas por L.L en s. coho inoculados con S.F. 1.2 de s. atlántico naturalmente infectados con L.L.



**Gráfico N°3: Curva de mortalidad diaria acumulada de s. coho asociada a L.L. en el grupo inoculado con S.F. 0.2 de s. atlántico naturalmente infectado con L.L.**



**Gráfico N°4: mortalidades diarias acumuladas de s. coho asociada a L.L. en el grupo inoculado con linfocitos de s. atlántico infectados en forma natural con L.L.**





**Tabla N°6: Tasa de mortalidad diaria y acumulada de s. coho con signos de L.L. tras haber sido inoculados con Sobrenadante crudo de s. atlántico infectados naturalmente con L.L.**

Días Post-	N=24			
	Mortalidad diaria		Mortalidad acumulada	
	N°	%	N°	%
0	0	0	0	0
45	1	4.1	1	4.1
8	1	4.1	2	8.3
55	1	4.1	3	12.5
59	1	4.1	4	16.6
63	1	4.1	5	20.8
65	1	4.1	6	25
74	1	4.1	7	29.2
120	1	4.1	8	33.3

**Tabla N°7: Tasa de mortalidad diaria y acumulada de s. coho con signos de L.L. tras haber sido inoculados con Sobrenadante filtrado poro 1.2um de s. atlántico infectados naturalmente con L.L.**

Días Post-	N=25			
	Mortalidad Diaria		Mortalidad Acumulada	
	N°	%	N°	%
0	0	0	0	0
34	1	4	1	4
39	1	4	2	8
49	1	4	3	12
53	1	4	4	16
59	1	4	5	20
65	1	4	6	24
67	2	8	8	32
72	1	4	9	36
74	1	4	10	40
109	1	4	11	44

**Tabla N°8: Tasa de mortalidad diaria y acumulada de s. coho con signos de L.L. tras haber sido inoculados con Sobrenadante filtrado poro 0.2um de s. atlántico infectados naturalmente con L.L.**

Días Post-	N=25			
	Mortalidad Diaria		Mortalidad Acumulada	
	N°	%	N°	%
0	0	0	0	0
34	2	8	2	8
39	1	4	3	1
41	1	4	4	16
45	1	4	5	20
49	1	4	6	24
52	1	4	7	28
63	2	8	9	36
65	1	4	10	40
67	1	4	11	44
68	1	4	12	48
69	1	4	13	52
74	1	4	14	56
116	1	4	15	60

**Tabla N°9: Tasa de mortalidad diaria y acumulada de s. coho con signos de L.L. tras haber sido inoculados con Linfocitos de s. atlántico infectados naturalmente con L.L.**

Días Post-	N=24			
	Mortalidad Diaria		Mortalidad	
	N°	%	N°	%
0	0	0	0	0
38	1	4.1	1	4.16
41	2	8.3	3	12.49
45	2	8.3	5	20.83
52	1	4.1	6	25
55	2	8.3	8	33.33
59	1	4.1	9	37.49
68	1	4.1	10	41.6
69	2	8.3	12	50
95	3	12.5	15	62.5
96	1	4.1	16	66.6