

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL
ICTIOPATOLOGIA**

**ESTUDIO DE SEGURIDAD Y DESARROLLO DE ANTICUERPOS ANTI IPN DE
UNA VACUNA COMERCIAL EN SALMON DEL ATLANTICO (*SALMO SALAR*).**

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

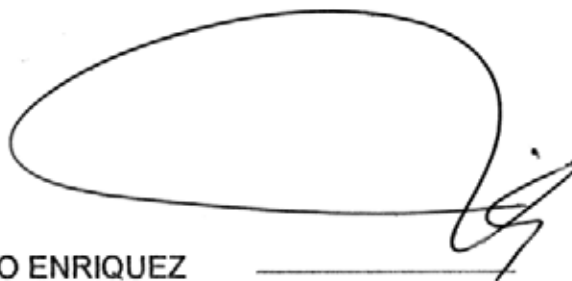
MAX HERNAN MÜLLER MENDEZ

VALDIVIA-CHILE

2001

PROFESOR PATROCINANTE:

RICARDO ENRIQUEZ



Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES: CARLOS FARIAS

Nombre



Firma

VICTOR CUBILLOS

Nombre



Firma

FECHA DE APROBACIÓN

INDICE

| | PAGINAS |
|----------------------|---------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODO | 9 |
| 5. RESULTADOS | 14 |
| 6. DISCUSIÓN | 18 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 22 |
| 8. AGRADECIMIENTOS | 24 |

1. RESUMEN

Estudio de seguridad y desarrollo de anticuerpos anti IPN de una vacuna comercial en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

A través de la presente investigación se midió el nivel de anticuerpos anti IPN producidos por una vacuna comercial en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), también se midió el grado de adherencias producidas por esta vacuna según la Tabla de Speilberg.

De 4 acuarios destinados al estudio de seguridad (adherencias); 2 acuarios vacunados con una vacuna comercial (acuario 2 y 3) en dosis de 0,2 ml vía intraperitoneal y 2 acuarios controles inoculados con solución fisiológica estéril (acuarios 5 y 6). Se utilizaron 35 peces en cada acuario, los cuales fueron evaluados mediante observación directa y con posterioridad a un examen externo e interno se clasificaron según la tabla de Speilberg a medida que se iban presentando las mortalidades.

En dos acuarios destinados al estudio de anticuerpos, uno con peces vacunados con la vacuna comercial en dosis de 0,2 ml vía intraperitoneal (acuario 1) y otro acuario inoculado con solución fisiológica estéril (acuario 4) con 21 peces cada uno. En los días 7,14,28,42,56,70,84 post-inoculación (P.I.) se obtuvieron 3 peces al azar del acuario 1 y 4 y se les tomó una muestra de sangre(0,5ml) sin anticoagulante; para que así posteriormente obtener el suero. La medición de anticuerpos anti IPN se realizó mediante el método de Seroneutralización.

La mortalidad acumulada para los acuarios 2 y 3 fue de 14,3% y 11,4% respectivamente con grados de adherencia según Speilberg entre 2 y 3 lo que se considera normal en la aplicación de vacunas i.p. en peces nacionales. En la medición de anticuerpos las diferencias entre el grupo control y el experimental fueron mínimas debido a factores específicos de las inmunoglobulinas en los peces.

Palabras claves: IPN, vacuna, seguridad.

2. SUMMARY

Safety test and development of anti-ipn antibodies of a commercial vaccine in Atlantic Saimón (*Salmo salar*).

Through this research the level of antibodies produced by the commercial vaccine in Atlantic Salmon was moderate (*Salmo salar*) as was also the degree of adhesions produced by the commercial vaccine were moderate according to the Speilberg Table.

There were 4 aquariums used in the security study (adhesions); two aquariums were vaccinated with commercial vaccine (aquarium 2 and 3) with 0,2 ml i.p. dose and two control aquariums were inoculated with a sterile physiological solution (aquarium 5 and 6) with 35 fish in each aquarium which made a total of 140 fish, which were evaluated by means of direct observation. After an external and internal examination they were classified according to Speilberg table as mortalities occurred.

There were two aquariums destined to the study of antibodies, one vaccinated with commercial vaccine with 0,2 ml i.p. doses (aquarium 1) and another aquarium inoculated with sterile physiological solution (aquarium 4) with 21 fish in each making a total of 42 fish. On post-inoculation days 7,14,28,42,56,70,84 (P.L) three fish from aquarium 1 were chosen at random and from aquarium 4 a blood sample without anticoagulant was taken in order to obtain the serum later; so that thus later the serum was obtained. The measurement of antibodies was made by means with the method of Seroneutralization.

The mortality accumulated for aquariums 2 and 3 was of 14,3% and 11,4% respectively, with degrees of adherence 2 and 3 according to Speilberg which, for fish in Chile, is considered normal. During the measurement of antibodies the differences between the control group and the experimental one were minimum due to specific factors of the immunoglobulins the fish.

Keywords: IPN, vaccine, security.

3. INTRODUCCION

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

En el país, el virus IPN (IPNV) fue aislado por primera vez en 1983 desde un stock de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*), las que nunca manifestaron signos de la enfermedad (McAllister y Reyes, 1984). Constituyó el primer reporte del virus en Sud América, sugiriendo las evidencias que el virus IPN fue introducido en 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 (Lozano, 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, corresponden al serotipo VR 299 de origen americano (Lozano, 1999). En la tabla 1, se muestran los distintos serotipos del virus IPN (Hill y Way, 1995).

Tabla 1: Clasificación de IPNV y origen geográfico de su aislamiento.

| Serogrupo | Serotipos | Aislamiento |
|--------------------|------------------------|--------------------|
| Serogrupo 1 | IPNV WB(VR 299) | U.S.A. |
| | IPNV SP | Europa |
| | IPNV AB | Europa |
| | IPNV He | Europa |
| | IPNV Te | Europa |
| | IPNV C1;C2;C3 | Canadá |
| | IPNV Jasper | Japón |
| Serogrupo 2 | IPNV N1 | Noruega |
| | IPNV TV-1 | Europa |

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 *Birnaviridae* (Brown, 1986) la cual comprende 3 géneros: *Aquabirnavirus* con la cepa tipo IPNV de peces y moluscos, *Avibirnavirus* que incluye el virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV) y *Entombirnavirus* (DXV) que agrupa a los Birnavirus aislados de insectos (Murphy, 1995). Fue descrita originalmente en Canadá, desde Salmón del Atlántico en 1940 y 20 años más tarde en truchas (*Salvelinus fontinalis* y *O. mykiss*) en Estados Unidos (Roberts, 1989).

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 adultos (en los cuales las infecciones son frecuentemente inaparentes) (Wolf, 1988). Generalmente se afectan primero los alevines y juveniles más grandes y de aspecto saludable (Hill, 1982).

Un signo importante es el aumento de la resistencia al IPN por parte del hospedador con la edad, los peces más susceptibles son aquellos que se encuentran en la etapa de primera alimentación y la mayor resistencia es alrededor de los 5 a 6 meses. Otro elemento importante es la temperatura del agua. La frecuencia de la enfermedad, en efecto, disminuye notablemente a temperaturas menores de 5.5 °C y mayores de 16°C (Quaglio, 1989).

Los signos clínicos de la enfermedad IPN pueden variar dependiendo 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 en el agua y densidad del cultivo (Roberts, 1989).

Al examen post mortem, el estómago y primera porción del intestino delgado aparece estático sin alimento y con presencia de mucus (a veces gelatinoso); en el recto hay líquido amarillento acuoso. El bazo e hígado están pálidos y la vesícula biliar puede estar dilatada y repleta de bilis; el área de los ciegos pilóricos (páncreas diseminado) muestra hemorragias petequiales (Quaglio, 1989). Las células acinares pancreáticas, y ocasionalmente la cubierta lípidica, sufren necrosis masiva caracterizada por picnosis, cariorexis e inclusiones intracitoplasmáticas. El epitelio intestinal necrótico se une con el exceso de mucus para formar un exudado catarral blanquecino que sale por el ano. Cambios degenerativos también ocurren en el tejido renal (porción hematopoyética y excretora) e hígado. El tejido pancreático y hepático están infiltrados por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. El microscopio electrónico revela la presencia de partículas virales en los tejidos pancreático,

hepático, renal y esplénico (Stoskopf, 1993). Las lesiones predominantes son degenerativas y necrosantes (Kinkelin y col. , 1991).

La transmisión de esta virosis ocurre por contacto directo entre peces, o a través del agua y otros vectores inanimados o animados, sin embargo, el peligro radica en que peces de otras especies infectados subclínicamente pueden ser fuente de IPNV (Wolf, 1988).

El IPNV 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 dos diferentes pisciculturas la enfermedad se presentó en la progenie de peces portadores, aun cuando las ovas habían sido desinfectadas con yodóforo viricida.

El diagnóstico presuntivo puede basarse en los signos de la enfermedad, histopatología de los tejidos y datos de anamnesis en la población de peces (Post, 1983). Sin embargo, para confirmar el diagnóstico se requiere del aislamiento del virus en cultivo celular. El IPNV es replicado en líneas celulares de peces tales como, BF-2, CHSE-214, EPC y RTG-2, entre otras. El virus IPN produce un (efecto citopático) CPE lítico en los cultivos celulares que se presenta a las 48 hrs; el CPE de IPNV se caracteriza por picnosis nuclear y un proceso de encogimiento celular de pequeñas placas visibles a 24 horas post infección para llegar a una destrucción celular total en 2 a 3 días post infección para el serotipo Sp, con una fuerte replicación (Roberts, 1989). Bajo condiciones favorables de cultivo el CPE raramente se presenta después de 5 días, En su ausencia, sin embargo, un siguiente pasaje debiera ser realizado (Wolf, 1988). Su identificación se basa en reactividad serológica a través de neutralización, anticuerpos fluorescentes, reacción de inmunoperoxidasa, fijación de complemento, inmunoelectroforesis, coaglutinación, Elisa (Stoskopf, 1993). Estos procedimientos de confirmación diagnóstica son los que más éxito han tenido en Noruega, Escocia y Chile, sin embargo en la actualidad existen otras opciones que se están desarrollando basadas en la 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).

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). Dado que esta enfermedad afecta principalmente al cultivo de peces de 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 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 zoonosanitarias abarcan la reducción del factor estrés antes y durante la transferencia al mar así como evitar la transferencia de smolts de diferentes procedencias a una misma localidad (Bustos y col. , 1999).

Tabla 2: Vacunas para Salmónidos disponibles en Chile o en proceso de desarrollo

| Vacuna | Patógeno que previene | Forma de administración | Laboratorio | Situación |
|----------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
| Bayobac I.P.N | IPN virus | Inyectable | Bayer S.A. | Etapa experimental |
| Autovacuna IPN | IPN virus | Inyectable | Aqua Health Chile | Etapa experimental |
| — | IPN virus | Inyectable | Recalcine | Etapa experimental |
| — | IPN virus | Inyectable e inmersión | Veterquímica | Etapa experimental |
| — | IPN virus | Inyectable | Alpharma | Etapa experimental |
| — | IPN virus | Inyectable | Bios Chile | Etapa experimental |
| Compact IPN | IPN virus | Inyectable | Intervet | Etapa experimental |
| Aquavac IPN | IPN virus | Inyectable y oral | AVL | Etapa experimental |

La vacunación es una de las herramientas de uso natural más eficaz en la prevención de enfermedades en cualquier programa de sanidad animal y humana que se instaure. Está establecido que su uso rutinario, dentro de un plan continuo de trabajo, disminuye el riesgo de aparición de enfermedades que son endémicas, es decir, de enfermedades de recurrente aparición en el lugar (Flores, 2000).

Su efectividad para el virus IPN está en estudio, ya que se están aplicando masivamente desde el año pasado. Hay reportes que algunas de ellas causan problemas de adherencias y está en discusión su rol protector debido a brotes de importante magnitud en peces vacunados (Flores, 2000). La tabla 2 resume las vacunas de IPNV que estarán disponibles para su aplicación en nuestro país.

Existen diferentes tipos de vacunas, las que se pueden agrupar básicamente en:

- ❖ Vacunas muertas: Aquellas que tienen el agente completo inactivado o subunidad del microorganismo.
- ❖ Vacunas vivas: Contienen el microorganismo vivo, atenuado naturalmente o por manipulación biológica o genética.

Tabla 3: Comparación entre vacunas vivas y vacunas muertas.

| Ventajas de las vacunas vivas | Ventajas de las vacunas muertas |
|--|---|
| Hay que inocular pocas dosis. No requiere coadyuvantes. Menores posibilidades de causar hipersensibilidad. Inducen la producción de interferón. Son relativamente baratas. | Son estables cuando se almacenan. Es poco probable que causen enfermedad debido a la virulencia residual. Es poco probable que contengan microorganismos contaminantes. |

Una vacuna ideal debe dar una inmunidad fuerte y prolongada junto a no causar efectos colaterales desfavorables; lamentablemente estas dos características tienden a ser mutuamente incompatibles. Así las vacunas vivas estimulan bien la respuesta inmunitaria, pero conllevan peligros debido a su virulencia residual; en

tanto que las vacunas muertas son menos eficaces como inmunógenas, pero suelen ser mucho más seguras (Tizard, 1987).

La aplicación de vacunas induce inmunidad específica en los peces lo que les permite defenderse de la infección natural y además no se generan residuos en el pez ni en el medio ambiente(Tizard, 1987).

Existen muchas situaciones donde es necesario intensificar la respuesta inmune, como la reacción de la respuesta inmunitaria normal para aumentar la protección, y el tratamiento de los trastornos inmunosupresores. Dentro de estos encontramos los coadyuvantes y los inmunoestimulantes(Tizard, 1987). Los coadyuvantes son sustancias que promueven la respuesta inmunitaria cuando se administran junto a los antígenos. Los más simples son los que funcionan haciendo lenta la liberación del antígeno en el organismo para así prolongar la respuesta inmunitaria, mezclando primero el antígeno con un coadyuvante insoluble para formar un depósito(sales de aluminio como hidróxido y fosfato). Después de la inyección, la mezcla de antígeno y sal forma un pequeño nódulo en los tejidos. El antígeno contenido en dicho nódulo se libera con lentitud en el organismo, y suministra así un estímulo antigénico prolongado. Los inmunoestimulantes no necesitan administrarse junto con los antígenos para aumentar una respuesta inmunitaria; en general se administran para provocar una intensificación del sistema inmunitario que no sea específica para un antígeno(Tizard, 1987).

Este estudio permitirá evaluar una vacuna para la prevención del IPNV en el país a través de la determinación de la respuesta a la vacuna comercial en S. del Atlántico mediante la cuantificación de anticuerpos específicos y el grado de adherencias y mortalidad asociada al producto.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 MANTENCION Y ALIMENTACION DE LOS PECES

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

Se utilizaron 242 peces de la especie Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 grs. obtenidos de una piscicultura ubicada en la X región sin historial de IPN.

Dichos peces fueron aclimatados durante 30 días antes del ensayo; donde se les realizó un completo chequeo sanitario (bacteriológico, parasitológico y virológico) a 60 peces tomados al azar del total de peces. Los resultados obtenidos fueron negativos a bacterias (*R. salmoninarum*; *P. salmonis*; *Flavobacterium sp.* ; *Y. ruckeri*, entre otros), a agentes virales citopatogénicos (IPNV) y parásitos (*Hexamita sp.* , *Ichthyophthirius multifiliis*) de acuerdo al *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*(O.I.E., 1997).

Los peces seleccionados fueron ubicados en 6 acuarios de 80x40 cm, de fibra de vidrio con una capacidad de 70 lt cada uno. El agua dulce se obtuvo de la red de agua potable la cual pasó por 3 filtros para eliminar trazas de Cl⁻ y metales pesados como el Zn⁺. Se cambió cada 3 días en un 70% de su totalidad lavando y desinfectando los filtros y difusores. Cada filtro tenía carbón activado y perlón. La función del carbón activado es neutralizar los desechos metabólicos (NH₄, CO₂) y la del perlón es filtrar los sólidos en suspensión. Se utilizaron 2 quechas, una para los acuarios vacunados y la otra para los controles, ya sea para sacar la mortalidad u obtener muestra de sangre.

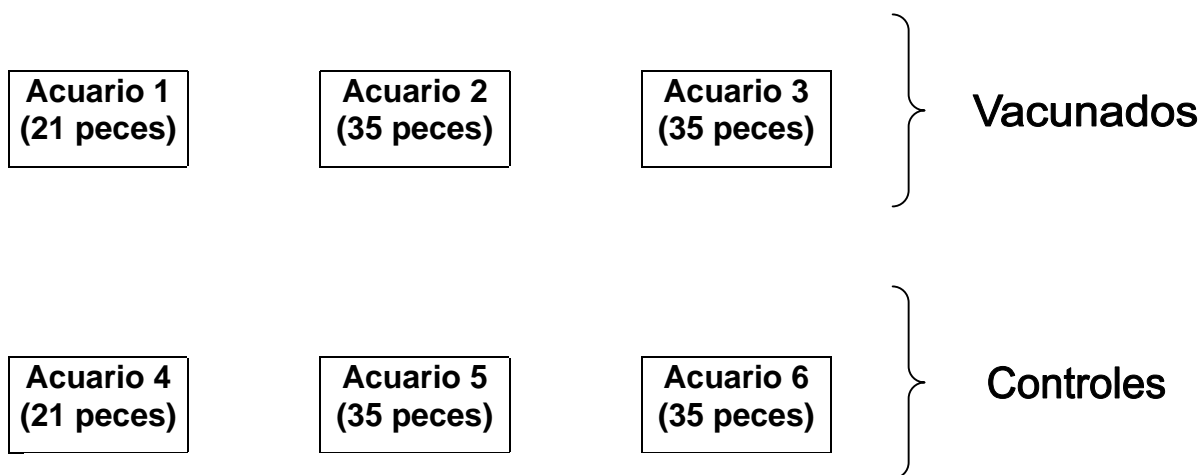
Cada acuario tenía un sistema de aireación doble; un sistema era mediante 3 bombas(1 bomba cada 2 acuarios) conectadas a la red eléctrica y el otro sistema era mediante 3 bombas(1 bomba cada 2 acuarios) conectadas a una batería con el propósito de oxigenar los acuarios para cuando no hubiese energía eléctrica y así constar con oxígeno las 24 hrs del día. Cada bomba tenía salida para 2 mangueras a las cuales se les colocó un difusor rectangular para así surtir en forma homogénea de oxígeno a los acuarios.

4.2 VACUNACIÓN

Se utilizaron 182 peces S. del Atlántico. Todos los peces fueron sometidos a la misma clase de manejos. Se suspendió la alimentación 24 hrs antes de la vacunación, posteriormente tanto los peces vacunados como los grupos controles, fueron alimentados con una dieta comercial extruída al 1,5% de su peso corporal/día. Se midió diariamente la temperatura, y permanecieron con luz natural y artificial durante las 24 hrs del día.

La vacunación se realizó siguiendo el procedimiento señalado a continuación: los peces previo ayuno de 24 hrs, se anestesiaron con Benzocaína(BZ-20®) (Etil p-aminobenzoato) en una concentración de 40 mg/lit y paralelamente se le inyectó oxígeno al agua, de tal modo, que no bajara de 10 ppm; posterior al efecto del anestésico se procedió a inocular a los grupos experimentales con 0,2 ml de la vacuna comercial en forma intraperitoneal insertando la aguja en la línea medio ventral, un largo de aleta anterior a las aletas pélvicas. Una vez vacunados los peces se trasladaron a los acuarios respectivos y se monitoreó su recuperación. Los peces controles se sometieron al mismo manejo, con la sola diferencia de que fueron inyectados con 0,2 ml de solución fisiológica estéril(NaCl 0.9% P/V). Para una buena diferenciación todos los acuarios fueron rotulados debidamente.

DIAGRAMA DE DISTRIBUCION DE LOS PECES VACUNADOS Y CONTROLES POR ACUARIOS



4.3 CRITERIOS DE DIAGNOSTICO, ACEPTACIÓN Y EXCLUSIÓN DE LOS PECES:

- Criterios de diagnóstico: tal como se señaló en la sección 4.1 se realizó un chequeo sanitario completo (bacteriológico, parasitológico y virológico) a 60 peces tomados al azar del estanque de origen donde los resultados obtenidos fueron negativos a bacterias (*R. salmoninarum*; *P. salmonis*; *Flavobacterium spp.* ; *Y. ruckeri*, entre otros), a agentes virales citopatógenicos (IPNV) y parásitos (*Hexamita sp*, *Ichthyophthirus multifilis*) de acuerdo al *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*, (O. I E., 1997)
- Criterios de Aceptación: se usan los peces del estanque solo si sortean con éxito los criterios de diagnóstico.
- Criterios de exclusión: no se usan los peces si los muestreados no sortean con éxito los criterios de diagnóstico y presentan mortalidad por otras enfermedades durante el ensayo, también mortalidades atribuibles a fallas en el Laboratorio por la inoculación experimental de peces controles y/o vacunados.

4.4 ESTUDIO DE SEGURIDAD (ADHERENCIAS)

Una vez que se obtuvieron los resultados del chequeo sanitario se procedió a distribuir en 6 acuarios los 182 peces: 2 acuarios de 21 peces cada uno y 4 acuarios de 35 peces cada uno. Los grupos experimentales fueron vacunados intraperitonealmente con 0,2 ml de vacuna comercial y los grupos controles con 0,2 ml de solución fisiológica estéril (0,85% NaCl).

Tabla N° 3: Distribución de S. del Atlántico inoculados intraperitonealmente (I.P.) con vacuna comercial y grupos controles en duplicado para el test de seguridad.

| Grupos | Número de acuario | Dosis | Número de peces |
|-----------|-------------------|-----------------------------|-----------------|
| Vacunados | 2 | 0.2ml (vacuna) | 35 |
| Vacunados | 3 | 0.2ml (vacuna) | 35 |
| Control | 5 | 0.2ml (sol Fisiol. estéril) | 35 |
| Control | 6 | 0.2ml (sol Fisiol. estéril) | 35 |

A los acuarios 2 y 3 de 35 peces cada uno vacunados (con vacuna comercial), se les tomó muestras de acuerdo a la mortalidad que se presentó en el transcurso del experimento, y se realizó, mediante observación directa y toma de fotos evaluación y posterior clasificación según la tabla de Speilberg (en anexo 1) y así determinar el grado de adherencias intraperitoneales que se originó.

Los acuarios (5 y 6) controles de 35 peces cada uno inyectados con suero fisiológico estéril, se les tomó muestras de acuerdo a la mortalidad observada en el transcurso del experimento, y se realizó, mediante observación directa y toma de fotos evaluación y posterior clasificación según tabla de Speilberg y así determinar el grado de adherencias intraperitoneales que origina la sustancia control durante el estudio y efectuar una comparación con los peces vacunados.

Se llevó un estricto control de las mortalidades diarias en una planilla, además se consignó todo hallazgo u observación que pudiese relacionarse con la mortalidad. Una vez recolectada la mortalidad diaria, en el laboratorio se les realizó examen clínico externo, interno y necropsia, posteriormente mediante observación y torna de fotos se determinó y clasificó el grado de adherencia en la cavidad abdominal.

4.5 ESTUDIO DE SERONEUTRALIZACION VIRAL

Tanto a los peces del acuario 1 y 4 se les tomo muestras de sangre para la prueba de Seroneutralización. La obtención de la sangre se realizó en los días: 7,14,28,42,56,70,84 post-inoculación (P.I). En cada periodo se obtuvieron 3 peces al azar del acuario 1 (grupo de 21 peces vacunados con vacuna comercial!) y del 4 (grupo control de 21 peces inoculados intraperitonealmente con solución fisiológica estéril). A los peces de ambos acuarios se les anestesió con Benzocaína(BZ-20®) y se les tomó una muestra de sangre (0,5ml) sin anticoagulante. Una vez obtenida la muestra de sangre con jeringas de tuberculina (1ml) e hipodérmica de 23G, se depositó en un tubo Ependorf y se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 hora, posteriormente se llevó a temperatura de refrigeración(4C°) por 24 horas obteniéndose el suero que se centrifugó a 3.000 rpm por 10 minutos. El suero se congeló a -20 C° hasta su posterior utilización mediante el método de Beta Neutralización, cuya ventaja es poder usar pequeñas cantidades de suero con bajas titulaciones de virus. En este método se usan diluciones seriadas de suero que son testeadas sobre la base de una dosis de virus que contenga 100 TCID₅₀ en 0.1 ml Se examinan los tubos 3 a 4 días después de la inoculación y se anota si el efecto citopático es positivo o negativo. La existencia de anticuerpos neutralizantes específicos en el suero originará la neutralización del virus. El título se calcula sobre la base de la dilución de suero que es capaz de neutralizar una cantidad dada de virus.

Tabla N° 4: Distribución de S. del Atlántico inoculados intraperitonealmente (I.P.) con la vacuna comercial y del grupo control para el test de anticuerpos anti-IPN

| Grupo | Número de acuario | Número de peces |
|----------|-------------------|-----------------|
| Vacunado | 1 | 21 |
| Control | 4 | 21 |

4.6 ANALISIS ESTADISTICOS

Evaluación de la seguridad: Se analizó estadísticamente las diferencias de las mortalidades de los grupos vacunados y controles usando un nivel de significación de $p < 0,05$.

El test estadístico utilizado fue el test del valor experimental cuya fórmula es:

$$T_0 = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{P_0 (1 - P_0) (1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Donde:

- T = Valor experimental observado.
- P1 = Proporción de muertos inoculados con vacuna.
- P2 = Proporción de muertos inoculados con solución fisiológica estéril.
- P0 = Proporción de muestras con mismo comportamiento.
- n1 = Número de peces inoculados con vacuna comercial.
- n2 = Número de peces inoculados con solución fisiológica estéril.

5. RESULTADOS

Los 131 peces que llegaron al final del experimento se sacrificaron el último día (8 de Enero) y se les realizó un examen clínico general y necropsia para determinar la presencia o ausencia de adherencias intraabdominales o en el punto de inoculación, estos 131 peces se clasificaron con grado de adherencia O (tabla N° 7) según la clasificación de Speilberg.

La respuesta inmunológica desarrollada por los peces controles y vacunados se evaluó mediante Seroneutralización para determinar con esto la inmunidad entregada por la vacuna.

Durante el experimento se midió la temperatura de los acuarios diariamente, la cual osciló entre 12-22 C° (anexo 2), obteniéndose un promedio para el estudio de 14.7 C°.

5.1 TEST DE SEGURIDAD (ADHERENCIAS)

Tabla N° 5: Distribución de la mortalidad y del grado de adherencias intraabdominales posterior a la aplicación intraperitoneal de la vacuna comercial en Salmo salar en vacunados y controles.

| Clasificación de Speilberg | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------------|---|----------|----------|---|---|---|------------|
| Acuarios vacunados y controles | Grado de adherencia | | | | | | | Total |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Acuario 2 vacunados | 30 | | 1 | 4 | | | | 35 |
| Acuario 3 vacunados | 31 | | 1 | 3 | | | | 35 |
| Acuario 5 controles | 35 | | | | | | | 35 |
| Acuario 6 controles | 35 | | | | | | | 35 |
| Total | 131 | | 2 | 7 | | | | 140 |

Tabla N° 6: Mortalidad acumulada asociada al grado de adherencias (Speilberg) del ensayo para los grupos vacunados y no vacunados en S. Atlántico según temperatura del agua.

| Mortalidad total | Vacunados | | No vacunados | | Total semanal | Temperatura semanal promedio (C°) |
|----------------------|----------------|----------------|--------------|----------|---------------|-----------------------------------|
| | Ac. 2 | Ac. 3 | Ac. 5 | Ac. 6 | | |
| Semana 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13.4 |
| Semana 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13.6 |
| Semana 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 4 | 14 |
| Semana 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 13.5 |
| Semana 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14.3 |
| Semana 6 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 14.4 |
| Semana 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 16.7 |
| Semana 8-13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17.7 |
| Total general | *5/14.3 | *4/11.4 | 0 | 0 | 9 | 14.7 |

*N/%

5.2 TEST DE ANTICUERPOS ANTI-IPNV

Tabla N° 7: Titulaciones de suero para IPNV en S. Atlántico en los vacunados y no vacunados mediante Seronutralización.

| Fecha obtención muestra | Titulación acuario 1 (Vacunado) | | | | Titulación acuario 4 (No Vacunado) | | | |
|-------------------------|------------------------------------|----------|----------|---------------------|---------------------------------------|----------|----------|---------------------|
| | Pez N° 1 | Pez N° 2 | Pez N° 3 | Promedio titulación | Pez N° 1 | Pez N° 2 | Pez N° 3 | Promedio titulación |
| 7 días P. | 1:128 | 1:128 | 1:128 | 1:128 | 1:64 | 1:64 | 1:128 | 1:77 |
| 14 días P. | 1:256 | S.I | 1:256 | 1:256 | 1:128 | 1:128 | 1:128 | 1:128 |
| 28 días P. | 1:256 | 1:256 | 1:256 | 1:256 | 1:128 | 1:128 | 1:64 | 1:96 |
| 42 días P. | 1:256 | S.I | 1:512 | 1:341 | 1:64 | S.I | 1:64 | 1:84 |
| 56 días P. | 1:128 | 1:128 | 1:64 | 1:96 | 1:64 | 1:64 | S.I | 1:64 |
| 70 días P. | 1:128 | 1:128 | S.I. | 1:128 | 1:128 | S.I | S.I. | 1:128 |
| 84 días P. | 1:64 | 1:128 | 1:128 | 1:96 | 1:64 | 1:64 | 1:128 | 1:77 |

El valor experimental en el análisis estadístico fue de 3,1 y el valor de tabla fue de 1,65. Por lo tanto, hay una evidencia estadística de que hay diferencia significativa en proporción de mortalidad entre los inoculados con vacuna comercial y los con solución fisiológica estéril.

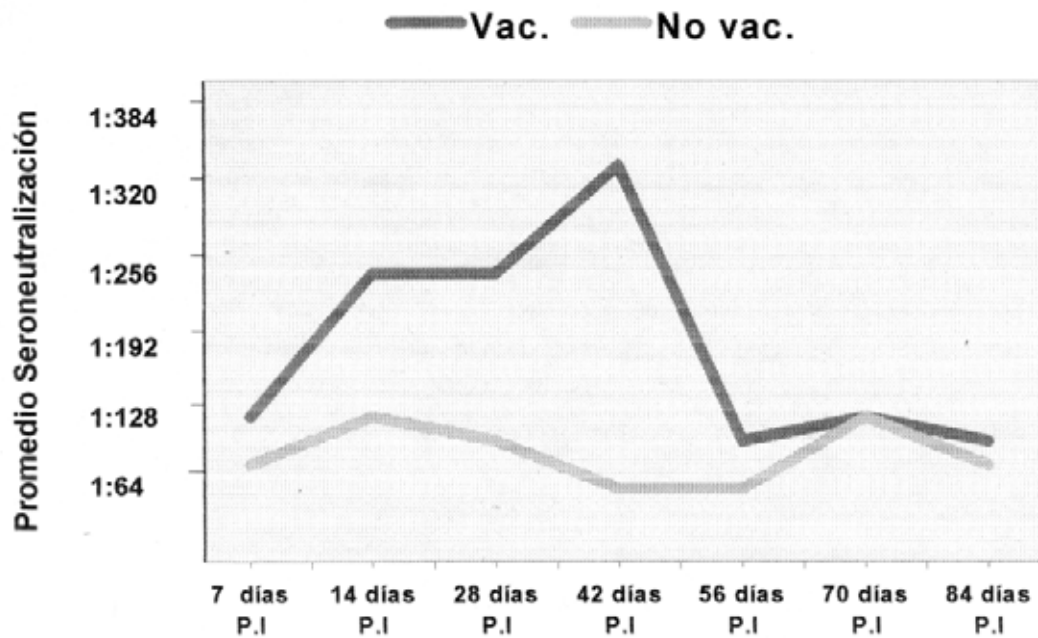


Figura 1: Comparación de seroneutralización entre grupos vacunados y no vacunados

6. DISCUSIÓN.

El control veterinario preventivo en la salmonicultura, considera la instauración de un conjunto de medidas tendientes a limitar la diseminación de patógenos y su erradicación de un área. Como por ejemplo, el uso alternado de lugares de cultivos, los programas de mejoramiento genético, óptima higiene y sanitización, calidad nutricional del alimento, adecuados sistemas de alimentación y control del proceso, manejo cuidadoso de los peces, mantención de la calidad del entorno ambiental, y apoyo al sistema de defensa con inmunoestimulantes, y sobre todo con el uso de vacunas (Flores, 2000).

La temperatura del medio ambiente influye directamente en los procesos metabólicos de los peces, incluso en el sistema inmune. Algunos experimentos realizados en salmón coho (*O. kisutch*) y carpas (*C. carpio*) demuestran que las bajas temperaturas tienen influencia directa sobre el periodo de latencia, es decir que los anticuerpos son diagnosticados mas tardíamente, a su vez, las altas temperaturas permiten una mejor respuesta del sistema inmune hasta ciertos límites, sobre los 18 C° se produce un estrés térmico que afecta directamente la respuesta inmune. El bajo porcentaje de saturación de oxígeno en el agua aunado a un rápido aumento de la flora oportunista en el medio acuático, como por ejemplo hongos del tipo saprolegnia, ejercen un efecto negativo en la salud de los peces (Parias, 1996. Comunicación personal).

La trucha arcoiris (*O. mykiss*) y los salmones son competentes inmunológicamente a temprana edad (Post, 1987). La trucha arco iris, por ejemplo pesando 0,3 gramos y 23 días después de iniciada la alimentación, desarrolló anticuerpos de *A. hydrophila* inyectada intraperitonealmente con un bacteria suspendida en un coadyuvante salino o de Freund (Post, 1987). Los salmones juveniles que pesaban 1.3 gr. tenían anticuerpos demostrables contra *A. salmonicida* a las cuatro semanas después de la inoculación intraperitoneal contra el antígeno. Estos datos indican que la inmunización de los peces muy jóvenes se puede realizar (Post, 1987). Los peces que se usaron en el ensayo pesaban como promedio 15 gr. por lo que estaban maduros inmunológicamente.

La investigación ha indicado que las inmunoglobulinas de peces son grandes macroglobulinas, y están en correlación directa con su estructura (Post, 1987). Los peces tienen poca fracción de inmunoglobulinas similares a IgG de animales superiores. IgG es el mayor componente tanto de compuestos antivirales, antibacterianos y de la antitoxina de animales superiores lo que hace cerca del 80% de todas las inmunoglobulinas. La clase principal de inmunoglobulinas de peces con la función bacteriana y viral del anticuerpo es similar a IgM de animales más avanzados. Así los peces reaccionarán en forma distinta a los antígenos bacterianos y virales formando IgM equivalente (Post, 1987).

Se pudiera agregar que los títulos de seroneutralización en los peces vacunados tendieron a ser bajos (1:64; 1:128; 1:256; 1:512) lo cual podría estar relacionado con la labilidad de las IgM de los peces a diferencia de los mamíferos, algunos manejos simples del suero obtenido de los peces como por ejemplo, el descongelar y volver a congelar podría traer como consecuencia un descenso en los títulos de anticuerpos del orden del 80% (Adams, 1996. Comunicación personal).

Existen tres características determinantes y llamativas en los anticuerpos de los peces que explican la labilidad de IgM; el primero es que tienen una baja afinidad intrínseca (afinidad del sitio de unión), el segundo es la aparente falta de capacidad de los anticuerpos para aumentar con el tiempo en afinidad después de la inmunización (maduración de afinidad), y por último la limitada cantidad de anticuerpos que los une al sitio heterogéneo (Iwama y Nakanishi, 1996).

Respecto del gráfico de anticuerpos y el alto nivel de titulación a los 7 días postinoculación, esta alta titulación se debería al posible contacto entre los peces y el virus anterior al periodo de estudio; ya que la diferencia de titulación entre vacunados y no vacunados se debería presentar a los 20 días aproximadamente; a anticuerpos protectores; interleukinas; interferones; y otras proteínas séricas como el complemento. Como recomendación se aconseja aplicar un booster de 0.1 ml a los 50 días posvacunación para aumentar los títulos que disminuyen el día 56; también pueden ser 2 dosis de 0.1 ml, la primera dosis el día 1 y la segunda dosis el día 50.

Se ha desarrollado un sistema para clasificar adherencias en peces vacunados llamada Tabla de Spielberg que es una medida subjetiva donde el examinador clasifica adherencias en la cavidad abdominal y punto de inoculación en una escala a partir de 0 a 6. Esto es importante para poder comparar diversas vacunas de acuerdo con factores adversos como adherencias en cavidad abdominal y punto de inoculación, melanosis en pared abdominal e intestino, crecimiento reducido, etc. Estos factores adversos se ven influenciados por el tipo de vacuna o tipo de adyuvante, talla de peces vacunados, temperatura posvacunación, higiene en la inyección (Skrudland, 2001).

Un estudio hecho en Noruega por Skrudland (2001) con una vacuna A tuvo grados de adherencia que fluctuaron entre 2 y 5 según la Tabla de Speilberg. En el caso de la vacuna evaluada en la presente investigación se observaron grados de adherencia que fluctuaron entre 0 y 3 en la Tabla de Speilberg en 131 peces para el grado 0; 2 peces para el grado 2 y 7 peces para el grado 3. En el presente estudio, como se puede observar en la tabla N° 6 la mortalidad acumulada asociada a las adherencias del grupo vacunado con la vacuna comercial llegó a 14,3% y 11,4% para los acuarios 2 y 3 respectivamente (la cual coincidió con un aumento en la temperatura de 1,1 C°); en contraparte con los acuarios inoculados con suero fisiológico estéril en los cuales no se presentó mortalidad.

Hay fuertes indicaciones que algunos productos vaccíneos dan más efectos adversos que otro. Esto probablemente se relaciona más con el adyuvante que con los antígenos, por otra parte, es posible apreciar que grupos distintos de peces vacunados con una misma vacuna tienen distintos niveles de adherencia. Los fabricantes de vacunas han hecho trabajos de investigación extensos sobre este aspecto en los últimos años. Los resultados muestran que la talla de los peces en la época de la vacunación es un factor importante. Los peces más grandes tienen un menor nivel de efectos adversos, por lo cual se recomienda vacunar desde los 20 gr hacia arriba y en este estudio el promedio de peso fue de 15 gr. Otros resultados indican que temperaturas más altas en el período posvacunación dan un mayor nivel de efectos adversos(Skrudland, 2001). Los peces que residen en aguas con bajas temperaturas (menores a 7° C) no producen en demasía inmunoglobulinas. El tiempo de la inmunorespuesta para la producción de anticuerpos está relacionada a la temperatura ambiental (Post, 1987).

Dentro de los efectos adversos las adherencias intraabdominales y del punto de inoculación son una respuesta inflamatoria al antígeno o aceite inyectados del adyuvante que puede producir una peritonitis local que termina con adherencias que implican órganos internos y pared abdominal, melanosis debido a una gran producción de melanomacrófagos y granulomas extensos en algunos casos; pudiéndose encontrar células fibroblásticas, macrófagos, linfocitos y distintos tipos de eosinófilos (Skrudland, 2001).

El control preventivo mediante inmunización, se ha iniciado en la salmonicultura nacional, sin embargo aún no se ha masificado. Este uso parcial limita los resultados esperados de estos productos, ya que lo que se busca en cualquier programa de vacunación, es lo que se denomina inmunidad de masa, es decir, mientras mayor es el nivel de individuos inmunizados, mayor es el nivel de protección contra los agentes infecciosos. Frente a esta situación la vacunación debe realizarse dentro de un programa integral de salud preventiva, la cual debe considerar prácticas de bioseguridad, un manejo de los peces que sea consecuente con el proceso y el objetivo que se pretende y por cierto la vacunación debe ser de toda la población

susceptible para que el desarrollo de inmunidad sea total y completa y no exista un foco que establezca una situación de desafío a peces que se encuentran en desarrollo de inmunidad o ya inmunizados (Flores, 2000).

Esta tesis aporta información y aplica metodologías para evaluar una vacuna comercial en desarrollar una respuesta inmune protectora, como también sus efectos adversos en una especie de gran importancia comercial para el país.

Bajo las condiciones del presente estudio se concluye que:

- ❖ La temperatura del agua no fue un factor causal de la presencia de adherencias, aunque hubo un leve aumento de ella.
- ❖ Los niveles de adherencias al parecer se relacionan probablemente más con el adyuvante que con los antígenos y por una insuficiente talla de los peces.
- ❖ Los bajos niveles de Seroneutralización viral del suero de los peces se deben a condiciones inherentes a las inmunoglobulinas como así también a los manejos que sufrió el suero obtenido.

7. BILIOGRAFIA

- **Adams, 1996.** Comunicación personal
- **Anhe, W. y R. Negele. 1985.** Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of Salmonids fish. Fish and Shellfish Pathology Academic Press London: 261-289.
- **Bootland, L.; Dobos, P. y Stevenson, R.1991.** The IPNV carrier state and demonstraron 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.
- **Bustos, P.; Midtlyng, P. y Maira, C. 1999.** IPN: un enorme desafío para la industria salmonera. Aqunoticias Internacional 48: 48-51.
- **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.
- **Parías, C. 1996.** Comunicación personal.
- **Flores, F. 2000.** Salmonicultura. Los salmones también se enferman.
- **Hill, B. 1982.** Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In Microbial Diseases of Fish, Ed. R. J. Roberts. Academic Press. London.
- **Hill y Way, 1995.** Modificado por Torunn Taksdal en Infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantis Salmón: infection triáis, pathogenesis and diagnostic method.
- **Kinkelin, P.; Ch. Michel y P. Ghíttino. 1991.** Tratado de las enfermedades de los peces. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- **Lozano, M. 1999.** Identificadas cepas de IPN. Aqunoticias Internacional 47: 19.

- **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.
- **Murphy, F. A. 1995.** Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Springer-Verlag, Wien.
- **Post, G. 1983.** Textbook of fish health. Ed. TFH.
- **Post, G. 1987.** 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.
- **Roberts, R. 1989.** Fish pathology. Ed. Baillière Tindall, Londres, Inglaterra.
- **Roselund, 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.
- **Skrudland, A. 2001.** Immunoprophylaxis and management practices in relation to improved fish health.
- **Stoskopf, M. 1993.** Fish medicine. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia.
- **Tizard, I. 1989.** Immunology Veterinarian.
- **Iwama y Nakanishi. 1996.** The Fish Immune System: Organism, Pathogen And Environment
- **Wolf, K. 1988.** Fish viruses and fish viral diseases. Ed. Ithaca, New York.

8. AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su constante apoyo durante mis estudios, a mis abuelos, hermanos y a Lonny.

Al Dr. Ricardo Enríquez por su ayuda durante la realización del presente estudio.

Anexo 1. Clasificación esquemática por lesiones intraabdominales vistas post vacunación intraperitoneal en Salmón del Atlántico pre Smolt.

| Escala | Apariencia visual de la cavidad abdominal | Severidad de la lesión |
|---------------|---|---|
| 0 | Lesiones no visibles | No |
| 1 | Adhesiones muy débiles frecuentemente localizadas en el sitio de la inyección. Poco probable que el operador las perciba. | Nada o poca opacidad del peritoneo post-evisceración. |
| 2 | Pocas adhesiones, las cuales pueden conectar colon, bazo o parte de ciegos pilóricos a la cavidad abdominal. Puede ser por observación errónea del operador durante la evisceración. | A veces, opacidad de peritoneo, se puede remover en forma manual las adhesiones. |
| 3 | Moderadas adhesiones, incluyendo partes más craneales de la cavidad abdominal, parcialmente involucra partes de ciegos pilóricos, hígado o ventrículos, conectándolos a la pared abdominal. Puede ser por observación errónea del operador. | Lesiones visibles menores post-evisceración, las cuales pueden ser removidas manualmente. |
| 4 | Mayores adhesiones con granulomas, interconectando extensivamente órganos internos, los cuales aparecen como una sola unidad, Probablemente, por observación errónea del operador | Moderadas lesiones pudiendo ser difíciles de remover manualmente. |
| 5 | Severas lesiones afectando casi todos los órganos internos cercanos en la cavidad abdominal. En grandes áreas, el peritoneo es engrosado y opaco, el filete puede tener lesiones o granulomas locales, prominentes y/o fuertemente pigmentados. | Deja daños visibles a la canal post-evisceración y remoción de lesiones. |
| 6 | Igual, más pronunciado que 5, frecuentemente con considerable cantidad de melatonina. Vísceras no se pueden sacar sin causar daño en integridad del filete. | Deja mayor daño de la canal. |

Tabla de Speilberg.

ANEXO 2

PROMEDIO DE TEMPERATURAS DIARIAS DURANTE EL ESTUDIO

| Días del mes | Octubre | Noviembre | Diciembre | Enero |
|--------------|---------|-----------|-----------|-------|
| 1 | | 14 C° | 16 C° | 17 C° |
| 2 | | 13 C° | 17 C° | 18 C° |
| 3 | | 13 C° | 17 C° | 20 C° |
| 4 | | 13 C° | 17 C° | 19 C° |
| 5 | | 13 C° | 18 C° | 18 C° |
| 6 | | 14 C° | 17 C° | 17 C° |
| 7 | | 14 C° | 18 C° | 18 C° |
| 8 | | 13 C° | 17 C° | 19 C° |
| 9 | | 14 C° | 18 C° | |
| 10 | | 13 C° | 19 C° | |
| 11 | | 12 C° | 16 C° | |
| 12 | | 14 C° | 17 C° | |
| 13 | | 14 C° | 17 C° | |
| 14 | | 13 C° | 18 C° | |
| 15 | | 13 C° | 16 C° | |
| 16 | 13 C° | 15 C° | 15 C° | |
| 17 | 14 C° | 17 C° | 15 C° | |
| 18 | 14 C° | 14 C° | 20 C° | |
| 19 | 14 C° | 14 C° | 20 C° | |
| 20 | 13 C° | 14 C° | 21 C° | |
| 21 | 13 C° | 14 C° | 22 C° | |
| 22 | 13 C° | 15 C° | 17 C° | |
| 23 | 13 C° | 14 C° | 16 C° | |
| 24 | 14 C° | 15 C° | 18 C° | |
| 25 | 15 C° | 14 C° | 17 C° | |
| 26 | 14 C° | 15 C° | 17 C° | |
| 27 | 14 C° | 15 C° | 16 C° | |
| 28 | 13 C° | 17 C° | 16 C° | |
| 29 | 12 C° | 18 C° | 17 C° | |
| 30 | 16 C° | 17 C° | 20 C° | |
| 31 | 16 C° | | 18 C° | |