

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGIA ANIMAL

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE DOS VACUNAS EXPERIMENTALES
BIVALENTES PARA EL CONTROL DE SEPTICEMIA RICKETTSIAL DEL
SALMÓN (SRS) Y NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN) EN SALMÓN
DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*)”.**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

MAURICIO ANDRES CRISTI QUIÑONES

VALDIVIA-CHILE

2003

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enríquez S.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Patricio Esquivel S.

Dr. Enrique Paredes H.

FECHA APROBACIÓN: 30 de Octubre del 2003

INDICE

	Página
1.- RESUMEN	1
2.- SUMMARY	2
3.- INTRODUCCIÓN	3
4.- MATERIAL Y MÉTODO	10
5.- RESULTADOS	15
6.- DISCUSIÓN	24
7.- BIBLIOGRAFÍA	31
8.- ANEXOS	37
9.- AGRADECIMIENTOS	45

1. RESUMEN

“Evaluación de la eficacia de dos vacunas experimentales bivalentes para el control de Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*)”.

Junto al desarrollo de la salmonicultura nacional han surgido agentes patógenos responsables de masivas mortalidades, entre estos *Piscirickettsia salmonis* causante de la Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) y el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), que se han diseminado en centros de cultivo de agua dulce, estuario y mar de todo el país.

Para aportar a su prevención y control, se evaluaron dos vacunas experimentales bivalentes para SRS e IPN en peces presmolt de salmón del Atlántico (*S. salar*). Para esto, los peces se dividieron en 3 grupos de 150 peces cada uno. Se efectuó el periodo de acondicionamiento, además de un chequeo sanitario de los peces. Luego fueron vacunados vía intraperitoneal con los productos experimentales A y B. Los peces ubicados en el primer estanque con el producto A, los del segundo con el producto B y los ubicados en el tercer estanque con solución fisiológica 0,85% NaCl. Luego de transcurridos un mínimo de 500°/día, la mitad de los peces de cada estanque fueron trasladados a acuarios para efectuar la prueba de potencia de las vacunas mediante el desafío con *P. salmonis* cepa R-29 en dosis de $1 \times 10^{5,8}$ TCID₅₀. Una vez concluido, se trasladó la otra mitad de los peces para realizar el desafío con IPNV serotipo Sp en dosis de $1 \times 10^{5,6}$ TCID₅₀. El desafío de los peces se realizó vía intraperitoneal y en agua de mar. Se distribuyeron en 6 acuarios con 35 peces cada uno. Se utilizaron 2 acuarios (duplicados) para cada producto (A, B) y no vacunados. Se registró la mortalidad diaria y se efectuaron exámenes para comprobar la mortalidad por los agentes en estudio. En los peces desafiados con SRS se realizó tinción de Gram e IFAT-SRS y en los peces desafiados con IPN cultivo celular e IFAT-IPNV. Además se registró la temperatura diaria y algunos parámetros del agua.

En la prueba de potencia se midió la eficacia de las vacunas mediante el RPS (Porcentaje relativo de sobrevivencia). Este no pudo ser determinado en el caso de los peces desafiados con *P. salmonis* ya que no sobrevivieron al desafío. En los peces desafiados con IPNV se obtuvo un RPS de 88,9% en los peces vacunados con producto experimental A y un 83,3% para los vacunados con producto experimental B, lo cual indica que los productos en estudio otorgan protección para IPN, aun cuando el desafío se puede considerar poco exigente.

Palabras clave: vacuna bivalente, IPN, SRS, salmón Atlántico.

2. SUMMARY

“Evaluation of the effectiveness of two bivalent experimental vaccines for the control of Salmon Rickettsial Septicemia (SRS) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in Atlantic salmon (*Salmo salar*).”

Together with the development of the Chilean salmon Industry, new pathogenic agents have been observed which are responsible for massive mortalities. Among these, *Piscirickettsia salmonis* which causes the Salmon Rickettsial Septicemia (SRS) and the Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) have been disseminated in fresh water, estuary and marine fish farms around the country.

In order to contribute to their prevention and control, two bivalent experimental vaccines for SRS and IPN in presmolt fish of *S. salar* were evaluated. For this, fish were divided in 3 groups of 150 fish each. Acclimatization and sanitary check of fish were carried out before the experiments started. These were then vaccinated via intraperitoneal with experimental products A and B. Fish located in the tank 1 received product A, those of the tank 2 received product B and fish located in tank 3 were injected with sterile saline solution (0.85% NaCl). After a minimum of 500°/day, half of the fish of each tank was transferred to aquariums to carry out the potency test of vaccines by means of challenging the fish with *P. salmonis* strain R-29 in dose of $1 \times 10^{5,8}$ TCID₅₀. Once concluded the first challenge, the other half of fish were transferred to perform the challenge with IPNV serotype Sp in dose of $1 \times 10^{5,6}$ TCID₅₀. Both challenges were carried out via intraperitoneal and in sea water. Fish were distributed in 6 aquariums containing 35 fish each. Two aquarium were used for each product (A, B) and saline. The daily mortality was register and examinations were performed to verify mortality by the agents in study. Fish challenged with *P. salmonis* were tested by Gram staining and IFAT-SRS while fish challenged with IPN, a cellular culture and IFAT-IPNV were used. Besides the daily temperature was registered together with some other water quality parameters.

In the potency test, the effectiveness of the vaccines was measured by means of the RPS (Relative Percentage of Survival). It was not possible to determine the RPS for *P. salmonis* because there was no survivors. Fish challenged with IPNV showed a RPS of 88.9% for product A and 83.3% in case of product B, which indicates that the products in study conferred protection against IPNV, even though the challenge can be considered little demanding.

Key Words: bivalent vaccine, IPN, SRS, Atlantic salmon.

3. INTRODUCCIÓN

El gran desarrollo que ha experimentado la salmonicultura, especialmente en la zona sur de nuestro país, la ha convertido en una de las actividades de mayor desarrollo y productividad, generando un crecimiento económico importante en el producto interno bruto nacional; como consecuencia de esto, Chile se ha convertido en el segundo productor de peces salmonídeos a nivel mundial (Méndez y Vidal, 1994).

La histórica situación privilegiada respecto a la ausencia de enfermedades en las poblaciones de peces en cultivo, se fue perdiendo paulatinamente (Méndez y Vidal, 1994). Inicialmente las enfermedades en salmónes de cultivo no representaban un problema de magnitud, sin embargo han surgido agentes patógenos responsables de masivas mortalidades, entre estos *Piscirickettsia salmonis* (Schäfer y col., 1990), la bacteria patógena causante de la Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS), patología que desde que se manifestara por primera vez a fines de la década pasada, ha llegado a representar cerca del 60% de mortalidad en Chile asociada a enfermedades (Aquanoticias, 1999) y el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) el cual ha provocado serios problemas en la industria nacional, siendo considerada la enfermedad mas importante de la salmonicultura noruega en los últimos años (Bustos y col., 1999).

3.1 SEPTICEMIA RICKETTSIAL DEL SALMON (SRS)

El microorganismo es intracelular obligado, Gram negativo, inmóvil, no encapsulado, pleomórfico, habitualmente cocoide, en pares o en forma de anillo y de un tamaño variable entre 0,5-1,5 μm de diámetro (Fryer y col., 1990; Cvitanich y col., 1991). Mediante microscopía electrónica se ha observado que el agente posee en la superficie del citoplasma tres capas: una membrana externa ondulada, una pared típica de células Gram negativas y una membrana interna citoplasmática, lo que es característico de agentes rickettsiales (Fryer y col., 1990).

La cepa de *P. salmonis*, aislada en el sur de Chile, fue designada LF-89 (Fryer y col., 1990). Desde entonces, agentes morfológicamente similares han sido identificados en salmónidos de diferentes áreas geográficas como Canadá, Escocia, Irlanda y Noruega (Fryer y Lannan, 1994).

Desde que esta patología se manifestara por primera vez, ha llegado a representar cerca del 60% de mortalidad asociada a enfermedades y las perdidas ascienden a casi US\$ 100 millones anuales (Aquanoticias, 1999; Sánchez, 2003).

La enfermedad ha sido descrita principalmente en agua de mar y estuarina (Bravo y Campos, 1989a y 1989b; Fryer y col., 1990; Branson y Nieto, 1991; Cvitanich y col., 1991) y

muy ocasionalmente en agua dulce (Bravo, 1994; Gaggero y col., 1995). Los brotes comienzan generalmente después de periodos de estrés ambiental, como temperaturas fluctuantes, blooms de algas no tóxicas y tormentas fuertes. Se ha sugerido que una nutrición inadecuada o el estrés severo son los posibles desencadenantes de la enfermedad (Branson y Nieto, 1991). Los brotes se presentan especialmente entre otoño y primavera, cuando las temperaturas oscilan entre 9 -16°C (Cvitanich y col., 1991). Se ha propuesto que el proceso de esmoltificación puede incrementar la susceptibilidad de los salmones infectados (Graumann y col., 1997).

Desde su aparición en 1989, la Piscirickettsiosis ha evolucionado en el tiempo con brotes más insidiosos, refractarios a tratamientos orales y con un aumento de la virulencia hacia la trucha arcoiris y el salmón del Atlántico. En el caso de esta última especie, hay informes que indican que en un mismo grupo de peces se puede presentar un segundo brote, situación que prácticamente no ocurría anteriormente (Cassigoli, 1994). Por otro lado, observaciones de terreno realizadas en el sur de nuestro país indican que los cuadros tienen una severidad y una presentación clínica variable, frente a condiciones similares de especie, edad y medidas de manejo (Rojas, 2000).

Actualmente, se estima que la mortalidad asociada a Piscirickettsiosis bordea el 15% de la biomasa de la industria nacional (Sánchez, 2003).

Clínicamente se define como una enfermedad septicémica en salmonídeos, que se presenta con pequeñas lesiones blanquecinas y úlceras hemorrágicas distribuidas en la piel (OIE, 2000).

En los estadios más avanzados de la enfermedad, se observa la piel marcadamente oscurecida a nivel del dorso y el abdomen abultado. A nivel cutáneo, se aprecian pequeñas induraciones epidérmicas, fragilidad de las escamas, hemorragias petequiales y equimóticas en la base de las aletas, vientre, zona perianal y periocular, presentando además una fuerte palidez branquial. Sin embargo, en infecciones agudas, la mortalidad puede ocurrir sin signos claros de la enfermedad (Bravo y Campos, 1989a y 1989b; Cvitanich y col., 1990; Garcés y col., 1991).

Para prevenir la presentación de esta enfermedad, diversas medidas de manejo son recomendadas a los productores de salmónidos, tales como mantener densidades apropiadas de peces por balsa-jaula y por área geográfica, minimizar el estrés, extraer periódicamente los especímenes muertos y moribundos, evitar que la sangre generada durante las operaciones de cosecha y de procesado sea vertida al mar, promover el descanso de los centros de cultivo, antes del ingreso de un nuevo lote de peces (“all in-all out”), eliminar las ovas de los reproductores positivos a *P. salmonis*, proporcionar dietas adecuadas (Cassigoli, 1994), el uso de sustancias estimulantes y protectores hepáticos (Sánchez, 2003).

Los resultados de las terapias con antibióticos vía oral o inyectable han sido inconsistentes y en general no han sido capaces de controlar la enfermedad en forma efectiva. Esto, además, ha estado correlacionado al posible hecho de la aparición de resistencia en

algunas cepas (Smith y col., 1996), variabilidad en los tiempos y dosis de aplicación de los fármacos y el uso cada vez mayor de nuevas alternativas de tratamiento. La localización intracelular de este microorganismo puede hacer posible que un número considerable de *Rickettsias* esté fuera del alcance de las concentraciones bactericidas de los antibióticos y de esta manera, mantener la infección en la fase de terapia (Lannan y Fryer, 1993).

Debido a limitaciones asociadas a la terapéutica, el desarrollo de vacunas efectivas y seguras podría ser de gran ayuda en la prevención y/o control de esta enfermedad. Ante esta problemática, diferentes grupos de investigadores han efectuado estudios con el propósito de desarrollar preparados vaccinales. Smith y col. (1995) vacunaron salmones coho “presmolt” a través de inyecciones IP con diferentes bacterinas, para luego desafiarlos mediante la transferencia a un sitio de cultivo marino con historia de Piscirickettsiosis endémica. En algunos grupos de peces vacunados se indujo una respuesta protectora, pero esto no ocurrió en forma consistente por lo que los autores sugirieron la necesidad de realizar nuevos ensayos bajo condiciones ambientales más controladas. Posteriormente, resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en truchas arcoiris y se evidenció un incremento moderado en los niveles de anticuerpos de los peces, mediante la prueba de radioinmunoensayo (Smith y col., 1997). A pesar de los innegables avances obtenidos, el conocimiento de la respuesta inmunitaria en los peces contra Piscirickettsiosis es aún limitado y se requiere de investigaciones adicionales para establecer el potencial rol de las vacunas. La genética y la variación antigénica de los diferentes aislados de *P. salmonis* podrían ser importantes herramientas en futuras estrategias para desarrollar vacunas (Smith y col., 1997).

Durante el año 2001 investigadores chilenos lograron secuenciar el genoma de *P. salmonis*. Este conocimiento dará origen a una serie de trabajos en el futuro en los cuales se va a poder trabajar en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y vacunas genéticas que están siendo desarrolladas (Sánchez, 2003).

3.2 NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN)

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) es miembro de la familia Birnaviridae y está incluido en el gran grupo de virus llamados “Birnavirus acuáticos” o Aquabirnavirus (Plumb, 1999). 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).

Existen 9 serotipos que varían en su grado de virulencia, pero reaccionan en forma cruzada al test de seroneutralización (Bustos y col., 1999). Los serotipos más comunes en Europa son el Ab y Sp, siendo patógeno solo el Sp. En Norteamérica, el serotipo predominante es el VR299. En Chile, dado que se han importado ovas desde Norteamérica y Europa, y que esta enfermedad se transmite verticalmente a través de las ovas, se encuentran presentes los dos serotipos más patógenos: Sp y VR299. En la Décima Región, el predominante es el de origen Europeo (Bustos y col., 1999).

En Chile el aislamiento del virus fue reportado en 1984 en el lago Llanquihue, como serotipo VR299 (Carvajal, 2000).

Estudios recientes realizados por Laboratorio Chile para el desarrollo de una vacuna contra IPN, dieron como resultado que el virus existente en Chile difiere del reportado en la literatura internacional y en nuestro país, hay por lo menos tres genovariantes que estarían afectando a la salmonicultura nacional (Aquanoticias, 2002).

Desafortunadamente en Chile, en los últimos años, ha existido una introducción y diseminación progresiva del virus de la necrosis pancreática infecciosa, debido a su elevada estabilidad ante las condiciones ambientales adversas y su amplia transmisión (vertical y horizontal) (Lozano y col., 2000).

IPN es una enfermedad sistémica aguda, que afecta principalmente a salmónidos. Brotes agudos de la enfermedad se observan en juveniles en el período de la primera alimentación y en el primer año posterior a la transferencia al mar (Christie, 1997; Bustos y col., 1999). Se presentan luego de una infección primaria o como un episodio agudo a causa de un estrés severo en una población de peces con infección crónica de IPNV (Christie, 1997).

Algunos supervivientes a la infección se transforman en portadores del virus, y son el reservorio de la infección en la generación contemporánea y subsiguiente (Mc Allister, 1988; Wolf, 1988).

Los peces juveniles son más sensibles al virus, por lo que el nivel de mortalidad que se registra es inversamente proporcional a la edad. Sin embargo, los datos indican que en Chile el impacto en agua dulce ha sido relativamente bajo, pero en los cultivos de la zona estuarina y mar (post-transferencia de smolt) se han producido severos brotes que han alcanzado 30 a 40% de mortalidad en el primer mes (Bustos y col, 1999).

En pre-smolt y smolt, IPN (sintomático) parece ocurrir solamente bajo la exposición directa del virus acompañado por factores de estrés, aumentos de temperatura, cambios fisiológicos como la esmoltificación, manejo y/o infección a causa de otros agentes (Bustos y col., 1999).

Durante el año 1999 en Chile, el virus se diseminó con suma rapidez a diversas pisciculturas, lagos, estuarios y el mar de la Décima Región, estimándose que un alto porcentaje de los salmones Atlántico (*Salmo salar*) transferidos al mar, podrían haber sido portadores del virus (Bustos y col., 1999).

El virus IPN también puede ser transmitido verticalmente, a través de las ovas. Se ha establecido que el virus se localiza principalmente por fuera de la ova y que penetra al huevo durante la fecundación (Quaglio, 1989).

Los signos clínicos de la enfermedad IPN pueden variar dependiendo del huésped afectado, el serotipo del virus y las condiciones ambientales prevalentes tales como la

temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de cultivo (Roberts, 1989). Los alevines largos, más robustos y pequeños fingerlings son normalmente los primeros en desarrollar los signos clínicos asociados a la enfermedad (Plumb, 1999). El cuadro clínico se caracteriza porque el pez presenta problemas de balance, con movimientos rotatorios en su mismo eje. Los signos externos incluyen exoftalmia, oscurecimiento de la piel, distensión abdominal, branquias pálidas, petequias en zona ventral y base de aletas (Wolf, 1988).

El virus IPN es replicado en una variedad de líneas celulares de peces salmonídeos y no salmonídeos (Roberts, 1989). Las líneas celulares más comúnmente usadas para aislar el virus son BF-2, CHSE-214, PG y RTG-2. El virus de salmonídeos se replica bien entre 10 y 26° C, pobremente a 4° C y nada a 30° C (Stoskopf, 1992). Temperatura de incubación de 15° C es comúnmente usada para el aislamiento del virus, donde el efecto citopático (CPE) usualmente aparece dentro de 48 horas (Wolf, 1988). El efecto citopático se caracteriza por picnosis nuclear y un proceso de encogimiento celular de pequeñas placas visibles a las 24 horas post infección, para llegar a una destrucción total a los 2 a 3 días post infección para el serotipo Sp (Roberts, 1989).

En los últimos años una serie de investigaciones se han llevado a cabo con el fin de encontrar nuevas formas de prevenir IPN. Entre éstas se encuentran la vacunación, medidas zoonosanitarias y la elección de líneas genéticas resistentes a la enfermedad (Bustos y col., 1999).

En cuanto a las medidas zoonosanitarias, se pueden mencionar: reducir el factor estrés, antes y durante la transferencia al mar (el sector salmonicultor noruego, se concentra principalmente en esta medida), evitar la diseminación del virus a partir de progenitores (screening y eliminación total de progenies en caso de que sus progenitores sean positivos), (Bustos y col., 1999), los peces vivos no deben transportarse a otra explotación y las ovas de peces de una explotación afectada no deben utilizarse en el futuro con fines de reproducción (Roberts y Shepherd, 1980), evitar contagio por intermedio del agua en la fase de cultivo en agua dulce y evitar la transferencia al mar de smolts de distintas procedencias en una misma localidad (Bustos y col., 1999).

3.3 VACUNACIÓN

Los primeros intentos de vacunación en peces en el mundo se realizaron en 1930, en Estados Unidos, para el control de la Furunculosis. Un par de décadas más tarde, el descubrimiento de los antibióticos hizo disminuir el interés por la aplicación de vacunas. Sin embargo, al alcanzar los cultivos una producción a gran escala en los años 80, sobre todo los del salmón, los agentes patógenos desarrollaron resistencia a los antibióticos y las vacunas volvieron a ganar terreno, convirtiéndose en el método más utilizado para el control de muchas enfermedades (Palacios, 2001).

Para enfermedades realmente devastadoras para la producción nacional todavía no existe una nutrida oferta de vacunas, debido a que aún no se cuenta con una evaluación

sistemática de los resultados obtenidos. Es lo que sucede con *Piscirickettsia salmonis* (SRS) y la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) (Palacios, 2001).

Algunos laboratorios mediante un permiso especial del SAG, aplican en centros de cultivo las llamadas “autovacunas” o vacunas autógenas. Estos productos son preparados para el usuario de acuerdo con sus requerimientos, normalmente se usan cuando se trata de enfermedades de distribución limitada a un sector geográfico específico o cuando no existe un producto comercial disponible para controlar la enfermedad (Palacios, 2001).

Durante largo tiempo, han existido vacunas de primera generación o tradicionales a base de bacterinas y virinas (bacterias o virus inactivados). En los últimos años, se sumaron las vacunas recombinantes y las de DNA, consideradas de segunda y tercera generación; en Chile existen vacunas de primera y segunda generación, utilizando adyuvantes que aumentan la capacidad inmunogénica de las vacunas (Carvajal, 2000).

Las vacunas recombinantes consisten en combinar material genético de un virus y la estructura sintética de otro microorganismo como levaduras o bacterias. Para desarrollar las vacunas se aíslan las partículas más antigénicas de un virus determinado y se observa qué fragmento del ADN del virus se encarga de la síntesis de los antígenos elegidos. Después se selecciona o aísla la fracción y se introduce en el material genético de otro microorganismo, bacteria o levadura, para que éste lo produzca en forma industrial (Carvajal, 2000).

Las vacunas de tercera generación o de ADN son aun más complejas que las otras y no requieren de un microorganismo como las bacterias o levaduras para multiplicarse, debido a que operan directamente en el pez. Para su elaboración se busca la secuencia de ADN que determina la creación del antígeno, igual que en el caso de las recombinantes, y ese trozo o secuencia de ADN se inocula, por vía intramuscular. Así esta información ingresa a una célula muscular del pez y se incorpora en ella. Luego la misma célula comienza a sintetizar la proteína o proteínas del antígeno y al salir de la célula se genera la respuesta inmune (Carvajal, 2000).

Existen tres métodos de vacunación: Por inyección, inmersión y administración oral (Horne, 1997).

Desde 1998 la industria salmoniculora nacional posee una vacuna orientada a reducir los efectos de *P. salmonis*. Si bien en la actualidad existe disparidad en los resultados y su eficacia es cuestionada, lo cierto es que se trata de una herramienta que cobra mayor validez cuando forma parte de una estrategia global de prevención de la enfermedad (Sánchez, 2003).

La Ricketvac Aqua^{®1}, de Laboratorios Recalcine, es una vacuna inyectable del tipo bacterina que fue inicialmente diseñada para dos aplicaciones. La primera se administra 45 días antes de trasladar los salmones al mar, posteriormente, la segunda vacunación se realiza

¹ Laboratorio Recalcine, Santiago, Chile.

cuando los peces llevan entre 4 y 5 meses en ambiente salino. En la actualidad existe la vacuna oleosa que requiere de una sola aplicación, la cual se aplica durante la fase de agua dulce previo al traslado al agua de mar, la cual evita los problemas de estrés producido por una excesiva manipulación (Aquanoticias, 1999). Información proveniente de empresas productoras y de algunos laboratorios farmacéuticos señalan que la efectividad de esta fluctúa entre un 20% y 70%, lo que se asocia directamente al cumplimiento de recomendaciones y manejos aplicados en los centros de cultivo (Sánchez, 2003).

En lo que respecta a IPN, en septiembre del 2001 se anunció por parte del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) la autorización para el ingreso ilimitado al país de vacunas contra esta enfermedad. Para la comercialización del producto se autorizó a cuatro laboratorios, pero el proceso de registro y autorización de las vacunas ante el SAG, sigue siendo bastante lento (Palacios, 2001).

Algunos métodos para determinar la eficacia y la potencia de una vacuna son:

- Porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS), superior al 75%.
- Aumento de la dosis letal 50.
- Aumento en el título de anticuerpos específicos neutralizantes.

A futuro, la expectativa en el área de la prevención sanitaria es que no sólo exista una mayor cantidad y diversidad de productos, sino que las innovaciones provengan de la disponibilidad de vacunas bivalentes y polivalentes. El objetivo es que, a través de una sola dosis, el pez reciba inmunización para varias enfermedades (Palacios, 2001).

Como hipótesis de esta tesis se señala que “Las vacunas experimentales bivalentes A y B, para el control de Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), otorgan protección a salmón del Atlántico (*Salmo salar*) desafiados con *Piscirickettsia salmonis* e IPNV”.

De lo anterior, el objetivo general de esta tesis es la evaluación de la eficacia de dos vacunas experimentales bivalentes en salmón del Atlántico (*S. salar*) a través del Porcentaje Relativo de Sobrevivencia (RPS) en peces vacunados y desafiados con *Piscirickettsia salmonis* e IPNV en agua de mar.

4. MATERIAL Y METODO

4.1. Aislados:

Se trabajó con la cepa nacional R-29 de *Piscirickettsia salmonis* y el aislado nacional 130/98 serotipo Sp del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) obtenidos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), ambos mantenidos en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.2. Vacunas:

Se utilizaron 2 vacunas experimentales bivalentes denominadas A y B, con un adyuvante de aceite mineral en base oleosa, en dosis de 0,2 ml/pez (dosis recomendada por el fabricante).

4.3. Células:

Tanto para *P. salmonis* como IPNV se usó la línea celular CHSE-214 (embrión de salmón chinook). La temperatura para la mantención y multiplicación de las células fue de 20°C y para la inoculación bacteriana y viral de 15°C. La inoculación se realizó en una monocapa celular utilizando un medio de cultivo MEM, a esto se adicionó 10% de suero fetal bovino en caso de mantención celular y un 2% para la inoculación. Para *P. salmonis* se usó sin antibióticos y la incubación se realizó por 14 días o hasta que el efecto citopático alcanzara el 100%, para IPNV se adicionó antibiótico para limitar el crecimiento bacteriano, utilizando penicilina y estreptomomicina en concentraciones de 100 UI/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

4.4. Solución fisiológica:

Solución salina estéril al 0,85% NaCl, inoculado a los peces no vacunados en dosis de 0,2 ml intraperitoneal.

4.5. Peces:

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron 480 alevines de salmón Atlántico (*Salmo salar*), de la cepa Fanad, con un peso de 15-20 g, mantenidos en agua dulce.

4.6. Materiales de Laboratorio:

Para la realización de este experimento se utilizaron las dependencias, equipamiento y materiales del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

4.7. Mantención de los alevines:

Los peces fueron trasladados desde una piscicultura sin historial de IPN y SRS hasta la Sala de Estanques del Laboratorio de Ictiopatología. Aquí se les realizó chequeo sanitario a 30 peces distribuyéndose el resto de los peces en 3 estanques, dejando 150 peces en cada uno, dispuestos con 500 l de agua, aireación constante utilizando bombas de oxígeno y un sistema de filtros de carbón activado, el agua dulce provenía de una vertiente con renovación constante. Se dispuso de un pediluvio y maniluvio con solución desinfectante (yodóforo) para evitar el ingreso de agentes y limitar a cualquier microorganismo contaminante que pudiera afectar el experimento. Los peces fueron aclimatados durante 30 días y su alimentación consistió en una dieta comercial al 2% de su peso vivo administrada mañana y tarde.

4.8. Chequeo sanitario:

Del total se tomaron a 30 peces al azar a los que se sometió a chequeo sanitario, para constatar su estado de salud y así descartar la presencia de enfermedades. Los peces se sacrificaron mediante baño con anestesia, luego fueron examinados externamente observando tamaño, peso, estado nutricional, continuidad de la piel, pérdida de escamas, integridad ocular, de las aletas, opérculos y bránquias. Posteriormente se realizó necropsia para el examen interno en busca de posibles alteraciones en la cavidad corporal, musculatura y órganos. Se sembró una muestra de riñón de cada pez en agar TSA (agar soya-tripticase), incubado a 20-22°C por 5 días, como control bacteriano y en agar MAO para Flavobacterias. Para la detección de bacterias también se tomaron muestras de riñón, hígado y bazo para tinción de Gram. Para el examen virológico se utilizaron muestras de riñón y bazo, inoculándose en línea celular CHSE-214, a 15°C, realizando 3 pasajes de 7 días cada uno. Finalmente se realizó el examen parasitológico a través de muestras de branquias e intestino.

4.9. Muestreo de órganos:

Durante el experimento se realizó necropsia a todos los peces moribundos y muertos. Posterior al examen macroscópico externo e interno se obtuvieron las siguientes muestras:

- Riñón, hígado y bazo para examen bacteriológico y tinción de Gram.
- Riñón y bazo para examen virológico.

4.10. Prueba de Potencia.

4.10.1. Vacunación:

Se utilizó la vía de inoculación intraperitoneal, inyectando 0,2 ml de los productos experimentales A, B y a los no vacunados 0,2 ml de solución fisiológica. Los peces fueron vacunados previo ayuno de 24 h y se anestesiaron por baño con Benzocaína en dosis de 50 ppm.

Tabla N°1: Metodología de vacunación para la prueba de potencia de 2 vacunas experimentales bivalentes en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g, en agua dulce.

Estanque	Grupo	Sustancia	Dosis por pez	N° de peces
1	Vacunado	Vacuna A	0,2 ml	150
2	Vacunado	Vacuna B	0,2 ml	150
3	No vacunado	Sol. fisiológica	0,2 ml	150

Una vez vacunados los peces se mantuvieron hasta cumplir un mínimo de 500°/día (50 días a 10° C), tiempo requerido para la producción de anticuerpos por indicaciones del laboratorio productor de las vacunas, antes de trasladar los peces para realizar el desafío. Diariamente se chequeó la temperatura del agua y se retiraron los peces moribundos y muertos, chequeándose las posibles causas con análisis bacteriológicos y virales siguiendo el procedimiento ya descrito. Semana por medio se realizó un control de pH, oxígeno disuelto y DBO₅. La alimentación continuó siendo la dieta comercial al 2% de su peso vivo administrada mañana y tarde.

4.10.2. Desafío:

La primera parte consistió en el desafío con SRS, para esto la mitad de los peces de cada estanque fueron trasladados a la Sala de Acuarios del Laboratorio de Ictiopatología. Una vez terminada esta prueba se llevó a cabo la segunda parte con el traslado de la otra mitad de los peces a la Sala de Acuarios para realizar el desafío con IPNV, esto para evitar una posible contaminación cruzada de los peces con los agentes en estudio. El desafío de los peces se realizó en duplicado, en acuarios de 80 l con recirculación de agua, utilizando filtros de carbón activado y un sistema aireación constante mediante bombas de oxígeno. El tipo de agua que se utilizó en el desafío fue agua de mar, la que en un principio se mantuvo en 15 ppm de salinidad durante la primera semana, aumentando gradualmente hasta llegar a 26 ppm. El chequeo de salinidad se realizó al cambiar el agua en los acuarios, lo cual se llevó a cabo cada 3 días en un 70% de su totalidad efectuándose también el lavado de los filtros. Toda el agua utilizada se desinfectó con Cloro (5%) por 24 horas antes de su eliminación.

Se consideraron para el desafío 420 peces ya que se eliminaron 30 peces después de una selección por condición y estado general.

4.10.2.1. Desafío con SRS:

Se realizó vía intraperitoneal con la cepa R29, en dosis de $1 \times 10^{5,8}$ TCID₅₀/0,1ml/pez, de la siguiente manera:

Tabla N°2: Metodología de inoculación de *P. salmonis* cepa R-29 para el desafío de salmón del Atlántico (*S. salar*) de 30-35 g, vacunados y no vacunados en agua salada a 26 ppm.

ACUARIO	GRUPO	VACUNA	TIPO DE AGUA	DOSIS POR PEZ	N° PECES
1	Vacunado	A	Agua salada	$1 \times 10^{5,8}$ TCID ₅₀	35
2	Vacunado	A	Agua salada	$1 \times 10^{5,8}$ TCID ₅₀	35
3	Vacunado	B	Agua salada	$1 \times 10^{5,8}$ TCID ₅₀	35
4	Vacunado	B	Agua salada	$1 \times 10^{5,8}$ TCID ₅₀	35
5	No vacunado		Agua salada	$1 \times 10^{5,8}$ TCID ₅₀	35
6	No vacunado		Agua salada	$1 \times 10^{5,8}$ TCID ₅₀	35

Para confirmar la presencia de la bacteria se realizó tinción de Gram de tejidos afectados (bazo, hígado y riñón) en cada uno de los peces moribundos y muertos desafiados, comprobándose por la técnica IFAT-SRS realizadas a muestras de riñón.

4.10.2.2. Desafío con IPNV:

Se realizó vía intraperitoneal con el serotipo Sp de IPNV en dosis de $1 \times 10^{5,6}$ TCID₅₀ /0,2ml/pez, de la siguiente manera:

Tabla N°3: Metodología de inoculación de IPNV serotipo Sp para el desafío de salmón del Atlántico (*S. salar*) de 30-35 g, vacunados y no vacunados en agua salada a 26 ppm.

ACUARIO	GRUPO	VACUNA	TIPO DE AGUA	DOSIS POR PEZ	N° PECES
1	Vacunado	A	Agua salada	$1 \times 10^{5,6}$ TCID ₅₀	35
2	Vacunado	A	Agua salada	$1 \times 10^{5,6}$ TCID ₅₀	35
3	Vacunado	B	Agua salada	$1 \times 10^{5,6}$ TCID ₅₀	35
4	Vacunado	B	Agua salada	$1 \times 10^{5,6}$ TCID ₅₀	35
5	No vacunado		Agua salada	$1 \times 10^{5,6}$ TCID ₅₀	35
6	No vacunado		Agua salada	$1 \times 10^{5,6}$ TCID ₅₀	35

Para confirmar la presencia viral se llevó a cabo el reislamiento del virus en cada uno de los peces moribundos y muertos desafiados, por medio de las técnicas de cultivo celular de pools de órganos (riñón y bazo), y comprobados por la técnica IFAT-IPNV. Además, se

tomaron muestras de riñón de 5 peces vacunados para realizar titulación de IPNV por gramo de órgano.

4.10.2.2.1. Aislamiento en cultivo celular:

Para este examen, las muestras de tejidos se obtuvieron con la máxima esterilidad posible. Luego de realizar la necropsia, se obtuvieron pequeños trozos de riñón y bazo provenientes de la mortalidad diaria por acuario, estas se colocaron en un tubo con medio de cultivo MEM (al 2% de suero fetal bovino) y antibióticos (400 UI de penicilina /ml y 400 µg de estreptomina /ml), que posteriormente se maceraron en un mortero con arena esterilizada. El homogeneizado fue centrifugado a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a 6°C, luego se recuperó el sobrenadante y se inoculó en monocapa celular (CHSE-214), una vez alcanzado el tiempo de absorción del virus (15°C/1 hora), se añadió en cada pocillo 1 ml de MEM con 2% de suero fetal bovino. La placa fue mantenida a 15°C en cámara de incubación, y observada diariamente hasta la aparición de efecto citopático (CPE) por 7 días, confirmando la presencia o ausencia del virus.

4.10.2.2.2. Titulación viral:

Se utilizaron muestras de riñón de 5 peces para someterlas a titulación por gramo de órgano. El título viral se obtuvo a través de diluciones seriadas de la muestra; para ello se realizaron diluciones en base 10, luego se agregó 0,1 ml de cada una de estas diluciones a un pocillo de una microplaca de titulación que contiene una monocapa de células CHSE-214, de 12-24 horas de incubación; cada dilución se sembró en triplicado, luego se esperaron 2 a 3 días con un máximo de 7 días, para realizar la lectura del CPE (efecto citopático) y el cálculo del título viral en TCID₅₀/ ml.

4.10.3. Cálculo del Porcentaje Relativo de Supervivencia:

Con los datos de mortalidad de los peces inoculados con vacunas A, B y no vacunados desafiados con SRS e IPNV se determinó el Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS) para definir la eficiencia y potencia de las vacunas en estudio.

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{Mortalidad peces vacunados}}{\% \text{Mortalidad peces no vacunados}} \right) \times 100$$

5. RESULTADOS

5.1. Aclimatación:

Durante el tiempo en que los peces fueron aclimatados no se observaron alteraciones ni comportamiento inadecuado, salvo el estrés propio del traslado de los peces.

5.2. Chequeo sanitario:

Como resultado del chequeo sanitario no se detectaron agentes bacterianos, virales ni parasitarios. Solo se observaron pequeños focos de melanización en muestras teñidas con Gram de riñón, hígado y bazo.

5.3. Vacunación:

Luego de este manejo se observó en los peces una disminución del apetito lo cual es un comportamiento normal propio de este manejo.

Durante el periodo post vacunación se registró y retiro la mortalidad diaria para la realización de exámenes bacteriológicos y virológicos, los cuales dieron resultados negativos.

Se realizaron mediciones diarias de temperatura y semana por medio de parámetros de oxígeno disuelto, DBO₅ y pH del agua proveniente de la vertiente, los que se presentan en el Anexo N°1.

Los peces utilizados para realizar el desafío con *P. salmonis* permanecieron por 118 días en total en la sala de estanques antes de ser desafiados, registrándose luego de las mediciones diarias de temperatura 1423° día. Los utilizados para el desafío con IPNV se mantuvieron en la sala de estanques por 163 días registrándose luego de las mediciones diarias de temperatura 2146° día (Anexo N°2).

5.4. Desafío con SRS

En esta etapa, al igual que en la anterior, se realizaron mediciones diarias de temperatura, como también de parámetros de agua (Anexo N°3).

5.4.1. Mortalidad:

En la tabla N°4 se puede observar la mortalidad acumulada ocurrida post desafío con *P. salmonis* en los acuarios en duplicado (Anexo N°4), tanto en los grupos de peces inoculados con vacuna A y B como en los grupos de peces no vacunados inoculados con solución fisiológica.

Tabla N°4: Promedio de la mortalidad diaria (D) y acumulada (A) en salmón del Atlántico (*S.salar*) de 30-35 g vacunados y no vacunados, post desafío i.p. con la cepa R 29 de *Piscirickettsia salmonis*, en agua de mar.

Días post desafío	Vacunados				No vacunados	
	A		B		C	
	D/A	%	D/A	%	D/A	%
8	3/3	4,2	0/0	0/0	1/1	1,4
9	45/48	68,5	28/28	40	34/35	50,0
10	21/69	98,5	37/65	92,8	35/70	100
11	1/70	100	1/66	94,2	0/70	100
14	0/70	100	3/69	98,57	0/70	100
16	0/70	100	1/70	100	0/70	100
Total	70	100	70	100	70	100

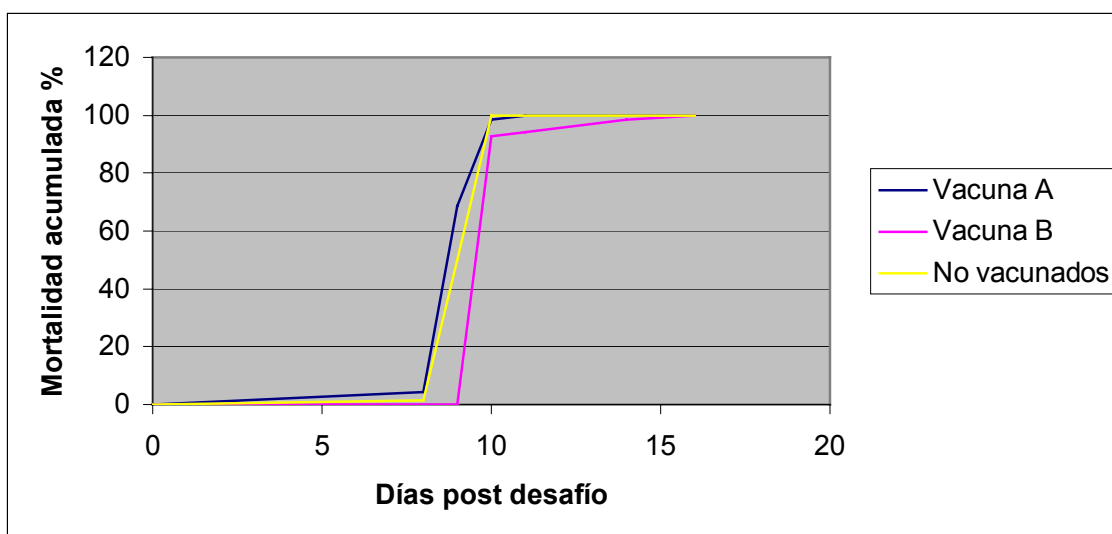


Grafico N°1: Porcentaje de mortalidad acumulada promedio en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 30-35 g, vacunados y no vacunados post desafío i.p. con la cepa R 29 de *Piscirickettsia salmonis*, en agua de mar.

En el grupo de peces inoculados con producto experimental A, la mortalidad se inició el día 8 post-inoculación (p.i.), el “peak” de mortalidad se presentó el día 9 p.i., llegando a un 100% la mortalidad acumulada el día 11 p.i. En el grupo de peces vacunados con producto experimental B, la mortalidad se inició el día 9 p.i., el “peak” de mortalidad se presentó el día

10 p.i., llegando a un 100% la mortalidad acumulada el día 16 p.i. En el grupo de peces no vacunados, la mortalidad se inició el día 8 p.i. el “peak” de mortalidad se presentó el día 10 p.i., llegando a un 100% la mortalidad acumulada ese mismo día (10 p.i.).

5.4.2. Resultado Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS):

A partir de los resultados de mortalidad presentados en la Tabla N°4, no se pudo aplicar la fórmula ya que no se presentaron peces sobrevivientes con los productos experimentales A y B.

5.4.3. Confirmación de la mortalidad por SRS:

5.4.3.1. Signología:

La signología observada post infección con SRS, tanto en los peces vacunados como no vacunados fue la siguiente:

- Anorexia, letargia, oscurecimiento de la piel, movimiento opercular aumentado, ausencia de reacción a estímulos externos, alteración en la natación, inicialmente natación superficial, luego permanencia en el fondo del acuario.
- Las lesiones macroscópicas externas encontradas fueron: palidez branquial, abdomen abultado, hemorragias equimóticas y petequiales en el abdomen, en la base de las aletas, zona periocular, perianal y alrededor del punto de inoculación.
- Luego de realizar la necropsia, en el examen interno se pudo apreciar: ascitis serosanguinolenta, reno, hepato y esplenomegalia, hígado pálido con pequeñas nodulaciones subcapsulares circulares de aprox. 1 mm de diámetro, hemorragias difusas en ciegos pilóricos, intestino y en la pared de la vejiga natatoria. Además, se observaron adherencias post vaccinales.

5.4.3.2. Tinción de Gram:

Los resultados al observar los frotis con tinción de Gram de bazo, hígado y riñón, mostraron una gran cantidad de bacterias Gram negativas tipo *Rickettsia* dispuestas en forma intra como extracelular formando grumos y melanosis tanto en los peces vacunados como en los no vacunados.

5.4.3.3. IFAT/SRS:

Se confirmó por IFAT/SRS la presencia de *P. salmonis* en los frotis de riñón, al observarse fluorescencia específica en las muestras.

5.5. Desafío con IPNV

En esta etapa al igual que en la anterior, se realizaron mediciones diarias de temperatura, como también de los parámetros de agua (Anexo N°5).

5.5.1 Mortalidad:

En la tabla N°5 se puede observar la mortalidad acumulada ocurrida post desafío con IPNV en los acuarios en duplicado (Anexo N°6), tanto en los grupos de peces inoculados con vacuna A y B como en los grupos de peces no vacunados inoculados con solución fisiológica.

Tabla N°5: Promedio de la mortalidad diaria (D) y acumulada (A) en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 30-35 g, vacunados y no vacunados post desafío i.p. con IPNV serotipo Sp, en agua de mar.

Días post desafío	Vacunados				No vacunados	
	A		B		C	
	D/A	%	D/A	%	D/A	%
3	0/0	0,00	0/0	0/0	2/2	2,85
4	0/0	0,00	0/0	0,00	3/5	7,14
6	0/0	0,00	0/0	0,00	1/6	8,57
7	0/0	0,00	0/0	0,00	2/8	11,42
8	0/0	0,00	0/0	0,00	1/9	12,85
12	0/0	0,00	0/0	0,00	1/10	14,28
14	1/1	1,42	0/0	0,00	2/12	17,14
24	0/1	1,42	0/0	0,00	0/12	17,14
31	0/1	1,42	0/0	0,00	1/13	18,57
34	0/1	1,42	1/1	1,42	2/15	21,42
36	0/1	1,42	1/2	2,85	0/15	21,42
37	1/2	2,85	0/2	2,85	0/15	21,42
40	0/2	2,85	1/3	4,28	1/16	22,85
42	0/2	2,85	0/3	4,28	2/18	25,71
Total	2	2,85	3	4,28	18	25,71

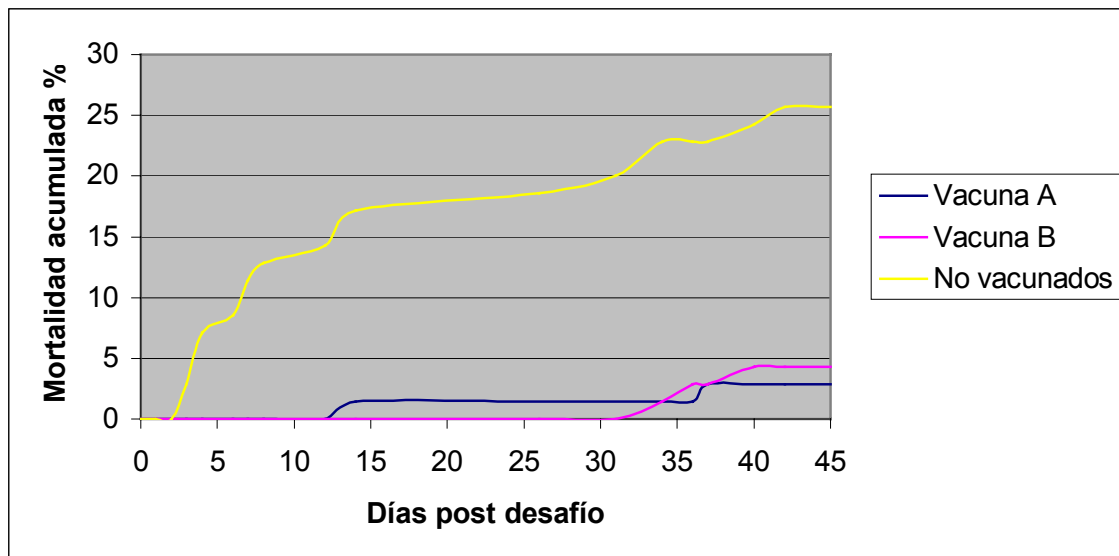


Grafico N°2: Porcentaje de mortalidad acumulada promedio en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 30-35 g, vacunados y no vacunados post desafío i.p. con serotipo Sp de IPNV, en agua de mar.

En el grupo de peces inoculados con producto experimental A, la mortalidad se inició el día 14 post-inoculación (p.i.) y se extendió hasta el día 37 p.i., alcanzando la mortalidad acumulada un 2,85%. En el grupo de peces inyectados con producto experimental B, la mortalidad se inició el día 34 post-inoculación (p.i.) y se extendió hasta el día 40 p.i., alcanzando la mortalidad acumulada un 4,28%. En el grupo de peces no vacunados, la mortalidad se inició el día 3 post-inoculación (p.i.) y se extendió hasta el día 42 p.i., alcanzando la mortalidad acumulada un 25,71%.

5.5.2. Resultado Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS):

A partir de los resultados de mortalidad presentados en la Tabla N°5 y al aplicar la fórmula de RPS se determinó lo siguiente:

% Mortalidad peces inoculados con vacuna A: 2,85%
 % Mortalidad peces no vacunados: 25,71%

RPS peces inoculado con vacuna A: 88,9%

% Mortalidad peces inoculados con vacuna B: 4,28%
 % Mortalidad peces no vacunados: 25,71%

RPS peces inoculado con vacuna B: 83,3%

5.5.3. Confirmación de la mortalidad por IPN:

5.5.3.1. Signología:

En los peces vacunados no se observó sintomatología clínica post infección con IPNV, en el caso de los peces no vacunados moribundos los signos clínicos observados fueron los siguientes:

- Anorexia, letargia, oscurecimiento de la piel, movimiento opercular aumentado, problemas de balance con movimientos rotatorios en su mismo eje, permanencia en el fondo del acuario.
- Las lesiones macroscópicas externas encontradas fueron: exoftalmia, branquias pálidas, aletas roídas, hemorragias petequiales en el abdomen y en base de aletas.
- Luego de realizar la necropsia se pudo apreciar: hígado pálido, ciegos pilóricos con hemorragias petequiales, esplenomegalia, enteritis y ausencia o escasa cantidad de alimento.

5.5.3.2. Reaislamiento y titulación:

En todas las muestras provenientes de la mortalidad diaria, se observó replicación viral en cultivo de células CHSE-214 con expresión de CPE entre el primer y tercer día después de infectar la monocapa.

El resultado de la titulación realizada a 5 peces vacunados mostró un título entre 1×10^2 y 1×10^3 de IPNV por gramo de órgano.

5.5.3.3. IFAT/IPNV:

Se confirmó por IFAT/IPNV que el CPE en el cultivo celular fue producido por IPNV, al observarse fluorescencia específica intracitoplasmática en las células infectadas.



Fig. N°1: Salmón del Atlántico inoculado con *P. salmonis*. Hígado con equimosis subcapsulares, esplenomegalia y ascitis serosa.

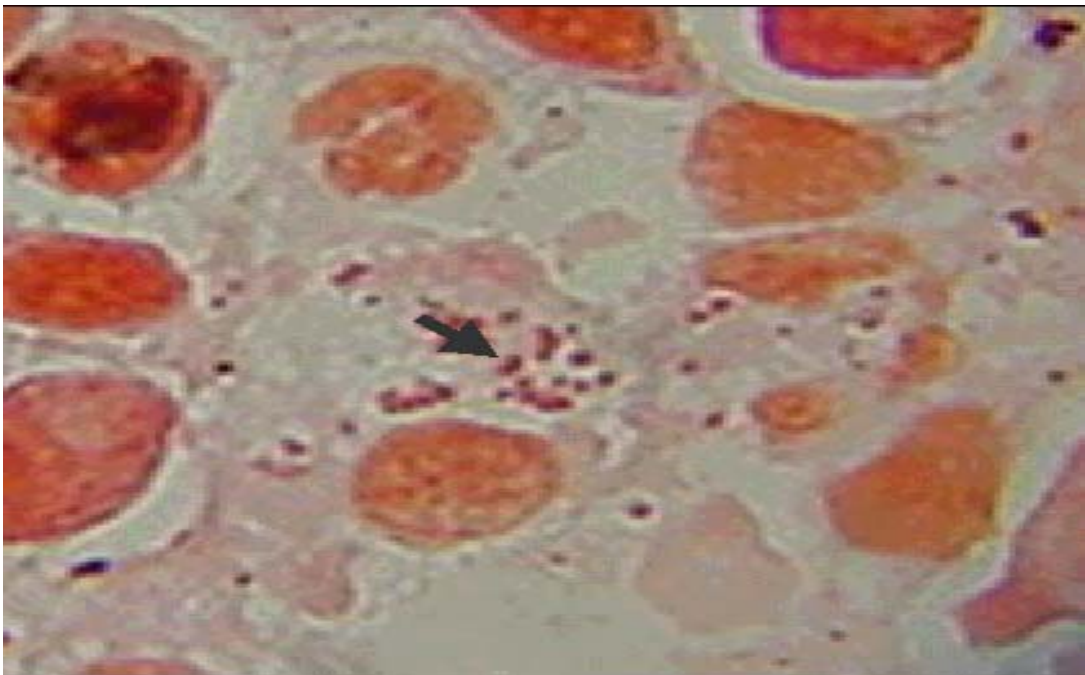


Fig. N°2: Frotis de riñón teñido con Gram, en donde se observan organismos tipo Rickettsia ubicados intra y extracelularmente. 1000X.

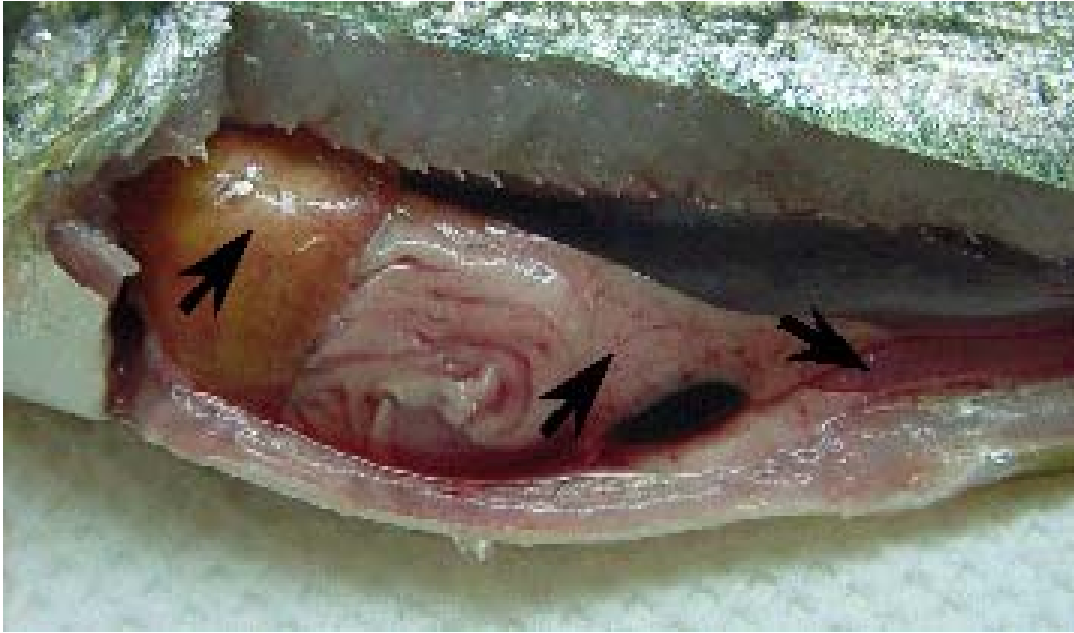


Fig. N°3: Salmón Atlántico inoculado con IPNV, con hígado pálido, enteritis, equimosis en ciegos pilóricos, grasa adyacente y enteritis.

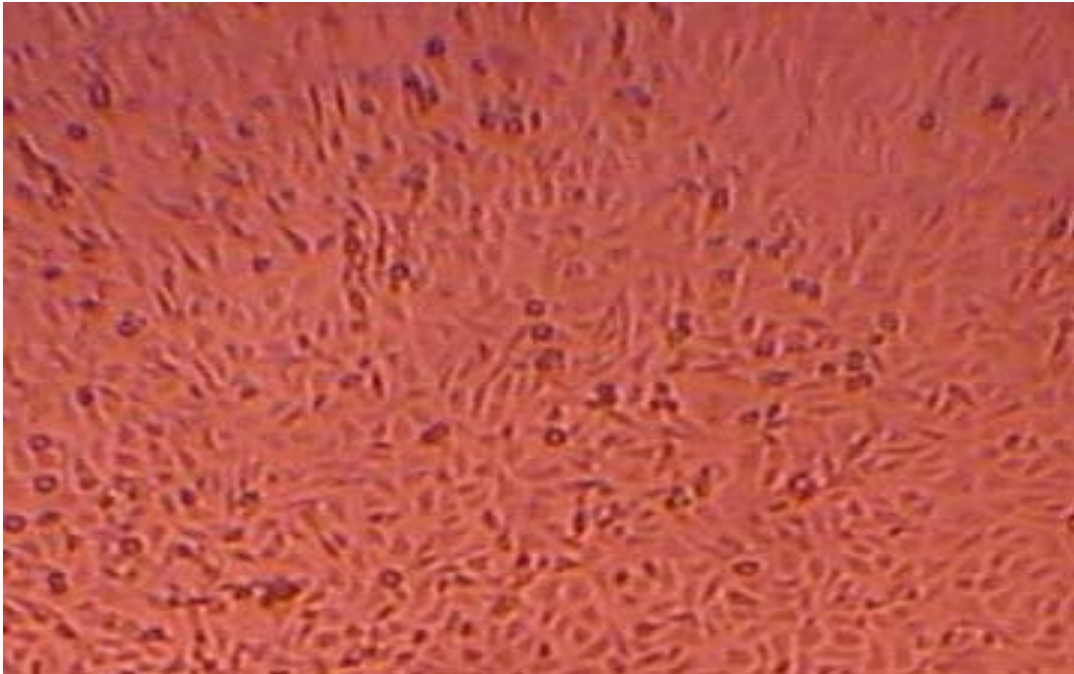


Fig. N°4: Monocapa celular de CHSE-214 no infectada. 400X.

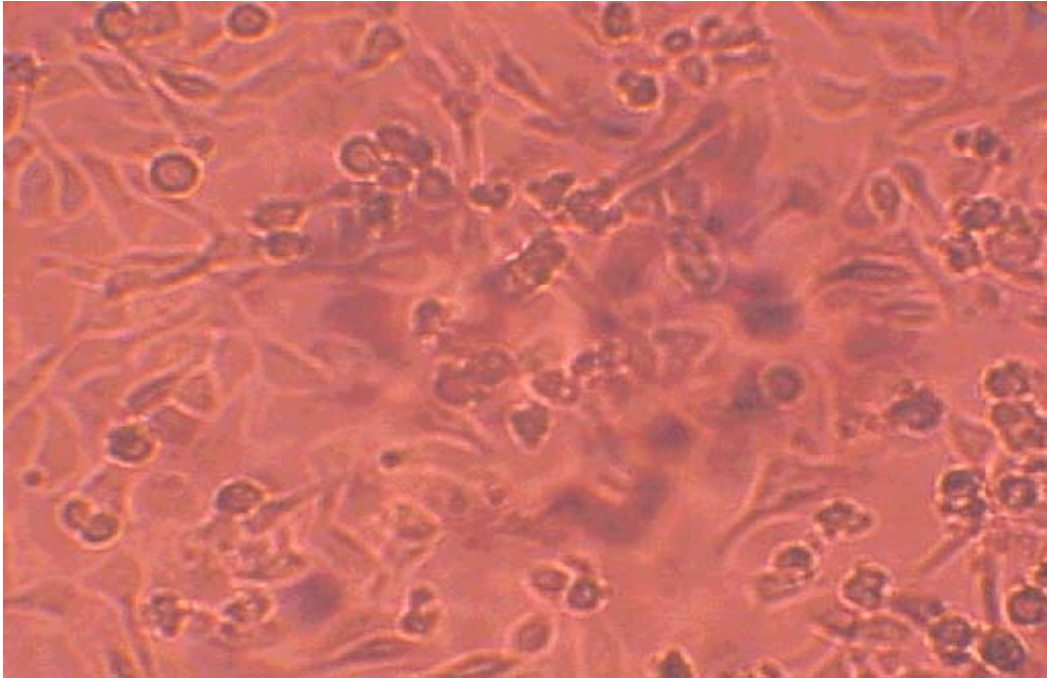


Fig. N°5: CPE de 3 días p.i causado por IPNV en CHSE-214. 400X.

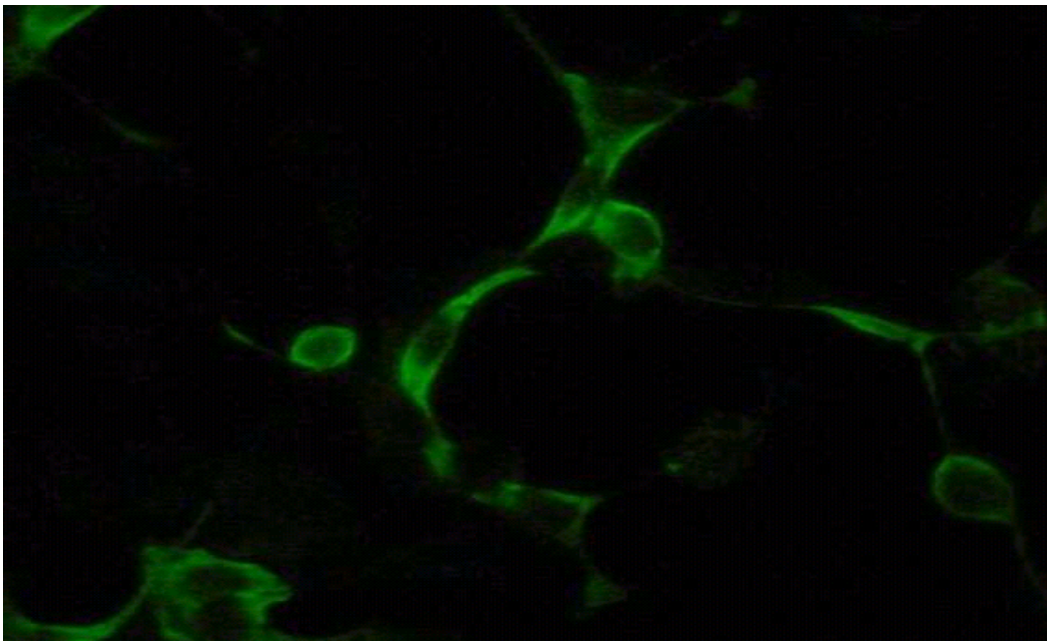


Fig. N°6: Células con fluorescencia específica intracitoplasmática que corresponde a IPNV.

6. DISCUSIÓN

La especie salmón del Atlántico (*Salmo salar*), es la más representativa en la producción mundial de salmónidos, esto respecto del volumen, número y distribución de países que la producen, representando el 75% del volumen cosechado el año 2002. En Chile el S. del Atlántico representa el 53% de las ventas totales (Aquanoticias, 2003a).

Considerando que esta especie es susceptible a las enfermedades “Síndrome Rickettsial Salmonídeo” causado por *P. salmonis* y a la “Necrosis Pancreática Infecciosa” causada por IPNV, es dable una mayor aplicación de las vacunas evaluadas en estudio, para la prevención y el control de estas enfermedades que causan las mayores pérdidas en la salmonicultura nacional (Palacios, 2001).

Los peces usados en esta investigación provinieron de una piscicultura de la Décima Región, en la cual no se han registrado brotes de IPN y SRS. De esta forma se evitó que los peces estuviesen infectados con estos agentes antes del experimento, lo cual podría haber alterado los resultados de la investigación. Además, durante el periodo de adaptación previo al experimento, los peces se presentaron clínicamente sanos y el chequeo sanitario efectuado confirmó el buen estado sanitario. Los focos de melanización encontrados en muestras de riñón, hígado y bazo teñidas con Gram, son propios del estado de estrés producto del traslado de los peces (Ellis, 1988).

La vía de aplicación de estas vacunas es la inyectable intraperitoneal, este es el método más usado en la industria del salmón ya que es la vía más potente de inmunización, la cual se extiende a todo el ciclo productivo, se tiene la certeza de que cada pez ha recibido la dosis adecuada, permite el uso de adyuvantes, tiene la mejor relación costo-beneficio en peces más grandes, pero a la vez presenta limitaciones como es que demanda mucho trabajo y genera estrés en los peces puesto que se requiere de anestesia y manejo (Horne, 1997; Carvajal, 2000).

Para el diseño del desafío se consideró la utilización de grupos de peces en duplicado conformados por 35 individuos cada uno, lo que permite fortalecer la validez de los resultados en este tipo de ensayos (Amend, 1981), además de servir de resguardo frente a posibles accidentes.

En este ensayo, se eligió la vía intraperitoneal para reproducir experimentalmente la enfermedad. Este método de inoculación tiene la ventaja que ya ha sido probado exitosamente tanto para SRS (Garcés y col., 1991; Contreras, 1995; Pizarro, 1998; Salinas, 1998; Ojeda, 2000) como para IPN (Stangeland y col., 1996; Taksdal y col., 1998; San Martín, 2001; Bowden y col., 2002; Mansilla, 2002) lo cual proporcionó una mayor certeza al experimento ya que se asegura la capacidad infectiva y virulencia del inóculo, y permite comparar sus resultados con otros ensayos anteriores. Sin embargo, se debe mencionar que la inyección de

agentes infecciosos por lo general no es un método de desafío natural, ya que muchos de los mecanismos de defensa, tanto específicos como inespecíficos, son artificialmente sobrepasados, por lo tanto es probable que esta vía artificial de desafío no esté relacionada con los mecanismos naturales de penetración que utiliza el agente patógeno. Además, es posible que los resultados obtenidos podrían variar si se emplearan otras rutas de infección (Amend, 1981).

Si bien recientemente se ha logrado con éxito la reproducción experimental de SRS utilizando el método de desafío por inmersión en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), esta técnica requiere ser estandarizada en cuanto a definición de tiempos de inmersión y de concentración bacteriana (Pizarro, 1998; Ojeda, 2000).

Las mortalidades registradas post desafío con *P. salmonis* cepa R 29, muestran que tanto en los peces vacunados con los productos experimentales A y B como en los no vacunados, alcanzan un 100%. Presentándose una leve diferencia en los días en que se produjo esta mortalidad entre los peces vacunados y los no vacunados. Para la vacuna A el 100% de mortalidad acumulada en los peces se alcanzó el día 11, para la vacuna B el día 16 y para los no vacunados el día 10 post desafío, lo que puede indicar algún grado de respuesta inmune protectora principalmente en el caso de la vacuna B pero que finalmente fue insuficiente para evitar la mortalidad en los peces a la dosis de $10^{5,8}$ TCID₅₀/ml de *P. salmonis*.

El inicio de las mortalidades en ensayos realizados en forma experimental han sido variables dependiendo de la dosis, cepa, vía de infección y especie utilizada. Estas van desde los 4 hasta los 20 días. En el caso de este trabajo las primeras mortalidades se produjeron a los 8 días post inoculación lo que se aproxima a ensayos realizados por Cvitanich (1991), Salinas (1998) y Rojas (2000).

Estos resultados no se alejan demasiado a lo ocurrido en terreno, donde a fines del año 2002 se presentó una serie de brotes de SRS en salmón del Atlántico en donde se observó una parcial eficacia de las vacunas para combatir la enfermedad (Aquanoticias, 2003b).

Hay que considerar la influencia de la recirculación del agua en la mortalidad de los peces. Neubrand (1992) y Salinas (1998) demostraron la excreción del agente a través de heces, bilis y orina en peces natural y experimentalmente infectados clínicamente sanos y en mayor porcentaje en peces con signos clínicos. En este estudio se utilizó un sistema de recirculación de agua donde esta se renovaba cada 3 días, lo que permite que aumente la carga del agente por acumulación en el medio, con lo que los peces pudieron recibir una mayor dosis del agente a la inoculada. Esto sumado al tiempo considerable de sobrevivencia de *P. salmonis* en agua salada (hasta 14 días a 15° C) determinado por Lannan y Fryer (1994) y a la alta densidad en la que se encontraban los peces, habría favorecido la mortalidad post desafío.

Otro factor que pudo haber influido en los resultados fueron las medidas de manejo a las que fueron expuestos durante el desafío como: utilización de agua salada, aumento de la densidad al utilizarse acuarios, aumentos de temperatura y disminución de la calidad del agua al emplearse un sistema de recirculación de agua. Estos pueden considerarse como estímulos o

agresiones externas de diversa intensidad y duración que pueden denominarse como agentes estresores (García-Belenguer y Mormede, 1993). La acción de estos produce una reacción de estrés en los peces, que podría disminuir la respuesta inmunitaria y facilitar la infección por agentes patógenos, que resulta de la ruptura accidental de las barreras tegumentarias (de Kinkelin y col., 1991). Los resultados de Pizarro (1998) demuestran que el estrés puede tener un rol importante en la presentación de los brotes de SRS.

El tipo de agua utilizada para el desafío con SRS e IPN fue agua salada, esto para simular las condiciones naturales en que se desarrollan estas enfermedades y así poder reproducirlas experimentalmente. En SRS los brotes se presentan en agua de mar y estuarina (Bravo y Campos, 1989a y 1989b; Fryer y col., 1990; Cvitanich y col., 1991; Branson y Nieto, 1991). En el caso de IPN brotes severos de la enfermedad se producen en el mar luego de la transferencia de los peces (Taksdal y col., 1998; Bustos y col., 1999; Bowden y col., 2002).

La salinidad en el desafío con SRS se mantuvo en 15 ppm durante la primera semana post inoculación, aumentando hasta llegar a 18 ppm en el transcurso del estudio. La salinidad para el desafío con IPN se mantuvo la primera semana post inoculación en 15 ppm aumentando gradualmente hasta llegar a 26 ppm que se mantuvo hasta el final del experimento. Estos aumentos graduales en la salinidad permitieron a los peces su adaptación a esta.

La temperatura promedio del agua durante el desafío con *P. salmonis* fue de 15,7° C. Fryer y col. (1990) determinaron que la temperatura óptima para la replicación “in vitro” de *P. salmonis* en cultivos celulares es entre 15-18° C. Por otra parte los brotes de esta enfermedad en condiciones naturales se presentan entre los 9 y 16° C (Lannan y Fryer, 1994). Considerando estos parámetros, en este estudio la temperatura se encontraría dentro del rango óptimo para el desarrollo de la bacteria lo cual facilita la reproducción de la enfermedad.

La dosis infectante de *P. salmonis* utilizada como DL₅₀ resultó ser elevada bajo las condiciones en que se desarrolló este estudio. Si bien la reproducción de la enfermedad en forma experimental vía intraperitoneal no presenta mayores dificultades, el problema ha sido estandarizar un modelo repetible, ya que los resultados de los experimentos realizados han sido variados dependiendo de factores propios del pez, del agente infectivo, del método de infección y del medio ambiente.

Landskron (2001) determinó la DL₅₀ en smolt de salmón del Atlántico de 50-100 g en 10^{4,3} TCID₅₀/ml, utilizando un aislado nacional de *P. salmonis* no especificado. Cabe destacar que se ha propuesto que el proceso de esmoltificación puede incrementar la susceptibilidad de los salmones (Graumann y col., 1997). Graumann y col., demostraron que en presmolt con dosis infectantes más altas se alcanzaron niveles de mortalidad mas bajos que en postsmolt de s. Atlántico.

Diferencias significativas en la virulencia de distintos aislados de *P. salmonis* han sido demostradas por Rojas (2000). Los resultados de Rojas demuestran las diferencias en la virulencia de los aislados LF-89, SLGO-94 y SLGO-95 en trucha arcoiris presmolt en las que

se empleo la vía ip. y se utilizaron 3 concentraciones distintas. Con la dosis mas alta utilizada 10^6 TCID₅₀/ml con la cepa LF-89 se alcanzó un nivel de mortalidad acumulada de un 60%, con la más virulenta la cepa SLGO-95 se alcanzó una mortalidad del 100% el día 19 post desafío. En este estudio lo más tardío en que se alcanzaron este nivel de mortalidad fue con la vacuna B el día 16 post desafío, lo que indicaría una alta virulencia del aislado utilizado.

Es importante considerar la existencia de diferencias de susceptibilidad entre distintas especies de salmónidos, esto, ya que ante una misma dosis infectiva se alcanzan distintos niveles de mortalidad, como lo determinó Contreras (1995) en estudios de infectividad en donde inoculó por vía intraperitoneal presmolt de salmon coho y trucha arcoiris con diferentes dosis de *P. salmonis* cepa LF-89. En ese estudio se logró calcular la DL₅₀ en salmón coho que fue de $10^{2.8}$ TCID₅₀/ml, en las trucha arcoiris no se pudo establecer, ya que las mortalidades no superaron el 30% con la concentración mas alta utilizada (10^3 TCID₅₀/ml). La DL₅₀ en t. arcoiris con cepa LF-89 fue determinada posteriormente por Pérez (1996), la que fue de 10^6 TCID₅₀/ml. Esta DL₅₀ determinada en t. arcoiris es superior a la utilizada en este estudio con *S. salar* en que se alcanzaron niveles de mortalidad de un 100% tanto en peces vacunados como en los no vacunados, lo que puede indicar diferencias en la susceptibilidad entre estas especies o lo más probable las diferencias de virulencia de las cepas utilizadas en ambos estudios.

La signología y las lesiones macroscópicas externas e internas corresponden a lo señalado por autores que han descrito la enfermedad tanto en su presentación natural (Bravo y Campos, 1989a y 1989b; Alvarado y col., 1990; Cubillos y col., 1990; Schafer y col., 1990) como experimental (Cvitanich, 1991; Garcés y col., 1991). Lesiones descritas en terreno como induraciones epidérmicas y úlceras hemorrágicas distribuidas en la piel no se presentaron, lo que coinciden con los estudios donde se ha reproducido experimentalmente la enfermedad (Contreras, 1995; Rojas, 2000), probablemente por la presentación aguda de la enfermedad “in vitro”.

El diagnóstico inicial de la enfermedad se realizó mediante frotis de muestras de los peces muertos desafiados teñidas con Gram, esto fue posteriormente confirmado mediante IFAT-SRS, desarrollado por Lannan y Fryer (1991) que es en la actualidad uno de los métodos más sensibles y específicos para el diagnóstico de esta enfermedad.

En el caso de los peces desafiados con IPNV, los resultados obtenidos demuestran que la mayor mortalidad acumulada se registró en el grupo de peces no vacunados con un 25,71% y que en los peces vacunados con los productos experimentales A y B, la mortalidad acumulada fue de un 2,85% y 4,28%, respectivamente. Estos resultados indican que las vacunas en estudio otorgan protección contra IPNV en la especie *S. salar*.

Las primeras mortalidades post desafío se produjeron en el grupo de los peces no vacunados el día 3 p.i, lo que se asemeja a los ensayos realizados por Stangeland y col. (1996) y Bowden y col., (2002). En la reproducción de la enfermedad realizado por Stangeland y col. se indica que las mortalidades tempranas se deberían a un estrés osmótico. En este tendría participación el virus al disminuir la capacidad osmoregulatoria de los peces. Los peces

vacunados mantenidos bajo las mismas condiciones, presentaron mortalidades más tardías, lo que indicaría protección otorgada por las vacunas en estudio. Las mayores mortalidades en los peces no vacunados se produjeron entre los días 3 y 14, lo que se aproxima a otros autores que han reproducido IPN en *S. salar* (Stangeland y col., 1996; Taksdal y col., 1998 y Bowden y col., 2002).

Brotos agudos de IPN con altas mortalidades se producen naturalmente en alevines de primera alimentación y en smolt en el primer año posterior a la transferencia al mar (Christie, 1997; Bustos y col., 1999).

En estudios experimentales solo peces muy jóvenes muestran desarrollo clínico de IPN, probablemente porque el sistema inmune no está suficientemente desarrollado (Tatner y Manning, 1985). Inmunidad humoral específica y celular se desarrollan coincidentemente con el inicio de la primera alimentación, lo que confiere protección a los peces (Taksdal y col., 1997).

La reproducción experimental de la enfermedad se ha logrado sin mayores problemas mediante desafío por baño en alevines con saco (Smail y col., 1986) y en alevines de primera alimentación (Taksdal y col., 1997). Peces mayores que han sido expuestos experimentalmente a IPNV desarrollan un estado de portador del virus, sin inducir mortalidad ni signos clínicos de la enfermedad (Bootland y col., 1986; Mc Allister y Owens, 1986; Taksdal y col., 1998).

En S. del Atlántico la enfermedad parece más compleja y es probablemente multifactorial (Christie, 1997). IPN sintomático en presmolt y smolt parece ocurrir solamente bajo la exposición directa del virus acompañado por factores de estrés adicional, como aumentos de temperatura, cambios fisiológicos como la esmoltificación, manejo y/o infección a causa de otros agentes (Christie, 1997; Bustos y col., 1999).

En este estudio se logró reproducir experimentalmente la enfermedad en presmolt de S. Atlántico, al ser expuestos al agente junto a las medidas de manejo señaladas en el desafío con *P. salmonis*, consideradas como agentes estresores. De manera similar que en otras investigaciones donde se ha reproducido la enfermedad utilizando *S. salar* presmolt (San Martín, 2001; Mansilla, 2002) y smolt (Stangeland y col., 1996; Taksdal y col., 1998 y Bowden y col., 2002).

De esta forma, la reproducción de IPN en peces presmolt y smolt se ha logrado con éxito pero no se ha conseguido estandarizar un modelo experimental que sea repetible debido a la variedad de factores que intervienen para que se produzca la enfermedad. Es así como Taksdal (1999) señala que los resultados de los experimentos son dependientes de factores tales como la condición de los peces experimentales (especie, cepa, edad, estado de madurez, exposición temprana a agentes infecciosos), del agente infeccioso (serotipo, cepa, grado de atenuación durante el cultivo celular, concentración), el método de infección (baño, cohabitación, inyección) y el medio ambiente (temperatura, calidad del agua, alimentación y

manejos estresantes). Todos estos factores interactúan y hacen difícil la comparación entre investigaciones.

La dosis utilizada de IPNV serotipo Sp de $10^{5.6}$ TCID₅₀, fue superior a la empleada por San Martín (2001), que con una dosis de IPNV serotipo Sp de $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ alcanzó durante el desafío una mortalidad promedio en el grupo control de alrededor de un 30%, comparado al 25% de mortalidad conseguido en este estudio.

El uso de cepas de peces que sean susceptibles a la infección con IPNV es decisivo para el resultado de las experimentaciones (Taksdal, 1999). Es así como se ha demostrado que algunas líneas de peces pueden ser más resistentes a la infección con IPNV, característica que puede ser heredable y fortalecida por cruzamientos selectivos (Stoskopf, 1992). A la posibilidad de que la línea de *S. salar* utilizada presente algún grado de resistencia a la enfermedad podría deberse el nivel disminuido de mortalidades alcanzado en el grupo control durante el desafío.

La signología y las lesiones macroscópicas externas e internas corresponden a lo señalado por autores que han descrito la enfermedad en su presentación natural (Wolf, 1988; Quaglio, 1989; Plumb, 1999; Taksdal y col., 1999), aunque esta se presentó en forma poco manifiesta. Esta se debería al tamaño de los peces, como también a la temperatura promedio del agua que fue de 17, 3° C. Quaglio (1989) señala que la patogenicidad del virus disminuye cuando la temperatura del agua es menor de 5,5° C y mayor de 16° C, lo que también habría influido en el nivel de mortalidades alcanzado.

El reisolamiento del virus en cultivos celulares se logró en todos los peces muertos desafiados tanto vacunados como no vacunados, en donde se expresó efecto citopático característico, lo que fue confirmado mediante IFAT-IPNV. Los títulos virales encontrados fueron bajos en los peces vacunados en comparación con los peces controles, esto indicaría que la respuesta inmune provocada por las vacunas impedirían la replicación del virus en el pez, lo que también es señalado en estudios realizados por Frost y Ness (1997).

Una vacuna para ser usada en peces debe cumplir con muchos criterios para ser satisfactoria, tales como: inmunogenicidad efectiva, protección cruzada contra todos los serotipos relevantes: como todos los serotipos de IPNV tienen algún grado de reacción cruzada, vacunas basadas en un serotipo representativo pueden entregar protección contra todos estos, protección durante todo el ciclo productivo, de fácil administración, segura, prevenir la formación de portadores y no menos importante debería tener bajo costo de producción (Christie, 1997).

En este caso al ser la vía de aplicación de las vacunas la inyectable intraperitoneal, no es posible su aplicación antes de la primera alimentación. Por lo que el objetivo de estas vacunas es proteger a los peces de los brotes de IPN producidos post transferencia al mar.

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) es la autoridad sanitaria encargada de autorizar los permisos de comercialización de las vacunas otorgando un registro de estas. Este señala

que para considerar satisfactoria una prueba de vacunas en salmónidos, el nivel de mortalidad en el grupo control debe ser idealmente sobre un 60% y el Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS) en los peces vacunados sobre un 75%. En este estudio se obtuvo un 25,71% de mortalidad acumulada en el grupo control de peces desafiados con IPNV, por lo que el nivel de mortalidades alcanzado para la evaluación de las vacunas experimentales A y B se considera como poco exigente.

Según Nordmo (1997) se puede evaluar una vacuna de acuerdo a tres categorías:

RPS < 70 = Vacunación Deficiente.

RPS > 70 = Vacunación Suficiente.

RPS > 80 = Vacunación Exitosa.

Para SRS no se pudo aplicar o calcular la fórmula de RPS, ya que los peces vacunados con productos experimentales A y B no sobrevivieron al desafío.

En el caso de IPN de acuerdo a esta clasificación, los productos experimentales A (88,9%) y B (83,3%) pueden catalogarse como “exitosos”.

CONCLUSIONES

- No se pudo determinar el RPS en los peces desafiados con *P. salmonis* ya que no sobrevivieron al desafío.
- En los peces desafiados con IPNV el RPS > 80% para ambas vacunas experimentales determina que estas otorgan protección contra la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), aunque el desafío se puede considerar poco exigente.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALVARADO, V., W. SCHÄFER, R. ENRÍQUEZ, M. MONRÁS, V. CUBILLOS, C. FARÍAS, A. ALBERDI. 1990. Síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. *Patología Animal* 4: 10-13.
- AMEND, D. 1981. Potency testing of fish vaccines. International Symposium in Fish Biologics: Serodiagnostics and vaccines. *Develop. Biol. Standard* 447-454.
- AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 1999. (Ed.) Martha L. Lozano. Vacunas: promesas de refuerzo 47: 6-15.
- AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 2002. (Ed.) Martha L. Lozano. Vacuna Chilena contra IPN 72: 38-39.
- AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 2003a. (Ed.) Lidia Vidal. Exportaciones primer cuatrimestre 79: 25.
- AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 2003b. (Ed.) Lidia Vidal. Alcance de Piscirickettsiosis en industria salmonicultora 79: 18-19.
- BOOTLAND, L.M., P. DOBOS, R.M. STEVENSON. 1986. Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout. *Dis. Aquat. Org.* 10: 13-21.
- BOWDEN, T., D. SMALL, A. ELLIS. 2002. Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 25: 555-563.
- BRANSON, E.J., D. NIETO DÍAZ-MUÑOZ. 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *J. Fish Dis.* 14: 147-156.
- BRAVO, S., M. CAMPOS. 1989a. Síndrome del Salmón Coho. *Chile Pesquero* 54: 47-48.
- BRAVO, S., M. CAMPOS. 1989b. Coho salmon syndrome in Chile. *FHS/AFS Newsletter* 17: 3.
- BRAVO, S. 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. *Bull. Eur. Ass. Fish Patol.* 14: 137 - 138.
- BUSTOS, P., P. MIDTLYNG., C. MAYRA. 1999. IPN: Un enorme desafío para la industria salmonera. *Aquanoticias Internacional* 48: 48-51.

- CARVAJAL, P. 2000. Industria creciente, vacunas para la salmonicultura. *Salmonoticias* 83: 11-15.
- CASSIGOLI, J. 1994. Patología y nutrición en el desarrollo de la acuicultura: Factores de éxito. En: Resúmenes de Seminario de Patología y nutrición en el desarrollo de la acuicultura: Factores de éxito. Fundación Chile, Puerto Montt, Chile. pp. 52-55.
- CHRISTIE, K.E. 1997. Immunization with Viral Antigens: Infectious Pancreatic Necrosis. *Fish Vaccinology* 90: 191-199.
- CONTRERAS, J.R. 1995. Infectividad de *Piscirickettsia salmonis* en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- CUBILLOS, V., C. FARÍAS, A. ALBERDI, V. ALVARADO, W. SCHÄFER, M. MONRÁS. 1990. Características anatomopatológicas del síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de los salmonídeos. *Patología Animal* 4: 14-17.
- CVITANICH, J., O. GARATE, C.E. SMITH. 1990. Etiological agent in a chilean coho disease isolated and confirmed by Koch's postulates. *FHS/AFS Newsletter* 18: 1-2.
- CVITANICH, J., O. GÁRATE, C.E. SMITH. 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis.* 14: 121-145.
- DE KINKELIN, P., CH. MICHEL, P. GHITTINO. 1991. Tratado de las enfermedades de los peces. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- ELLIS, A.E. 1988. Optimizing Factors for Fish Vaccination. *Fish Vaccination* 3: 32-46.
- FROST, P., A. NESS. 1997. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish and Shellfish Immunol.* 7: 609-619.
- FRYER, J.L., C. LANNAN, L. GARCÉS, J. LARENAS, P. SMITH. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from disease coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology* 25: 107-114.
- FRYER, J.L., C.N. LANNAN. 1994. Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves, and crustaceans. *Zoological Studies* 33: 95 - 105.
- GAGGERO, A., H. CASTRO, A.M. SANDINO. 1995. First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. *J. Fish Dis.* 18: 277 - 279.

- GARCES, L.H., J.J. LARENAS, P.A. SMITH, S. SANDINO, C.N. LANNAN, J.L. FRYER. 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Dis. Aquat. Org.* 11: 93-97.
- GARCIA-BELENGUER, S., P. MORMEDE. 1993. Nuevo concepto de estrés en ganadería: Psicobiología y Neurobiología de la adaptación. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim.* 8: 86-110.
- GRAUMANN, R., R. ENRÍQUEZ, M. MONRÁS, A.W. BROWN, H. ROSENTHAL. 1997. Experimental challenge of *Piscirickettsia salmonis* in postsmolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*). En: *VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish*. Abstracts Book. Heriot-Watt University, Edinburgh, European Association of Fish Pathologists.
- HORNE, M.T. 1997. Technical Aspects of the Administration of Vaccines. *Fish Vaccinology* 90: 79-89.
- LANDSKRON, E. 2001. Análisis de la respuesta inmune humoral y celular desarrollada por *S. salar* infectados experimentalmente con *Piscirickettsia salmonis*. Tesis Magíster en Ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- LANNAN, C., J. FRYER. 1991. Recommended method for inspection of fish for the salmonid rickettsia. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 11: 135-136.
- LANNAN, C., J. FRYER. 1993. *Piscirickettsia salmonis*, a major pathogen of salmonid fish in Chile. *Fisheries Research* 17: 115-121.
- LANNAN, C., J. FRYER. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 17: 545-548.
- LOZANO, M., A. ALVIAL, M. CAMPOS, C. ESTRADA. 2000. Compendio de la acuicultura y la pesca en Chile. Ed. Technopress, Santiago, Chile.
- MANSILLA, A. 2002. Estudio de seguridad y potencia de una vacuna inyectable para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmones del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- McALLISTER, P., W. OWENS. 1986. Infectious pancreatic necrosis virus: protocol for a standard challenge to brook trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 466-470.
- McALLISTER, E. 1988. Infecciones virales en peces cultivados. Patología en Acuicultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- MENDEZ, R., L. VIDAL. 1994. La salmonicultura chilena durante 1993. *Aquanoticias Internacional* 20: 5-14.

- NEUBRAND, E. 1992. Untersuchungen zur Pathologie des Cohosyndroms bei Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*). Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians Universität, München. pp. 113.
- NORDMO, R. 1997. Strengths and Weaknesses of Different Challenge Methods. In Gudding, R., A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, F. Brown. Fish Vaccinology, Karger, Basel.
- OJEDA, P. 2000. Estudio de piel y branquias como vías de ingreso de *Piscirickettsia salmonis* y evaluación de métodos de desafío experimental para piscirickettsiosis en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- ORGANIZACION INTERNACIONAL DES EPIZOOTIAS (OIE). 2000. Diagnostic Manual for Aquatic animal diseases. 3° Edition. Ed. by the O.I.E. fish diseases domminion, París.
- PALACIOS, S. 2001. Vacunas para salmone: qué ofrece Chile a los productores. *Aquanoticias Internacional* 62: 58-62.
- PEREZ, B. 1996. Desafío experimental en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con *Piscirickettsia salmonis* usando tres esquemas de inoculación. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- PIZARRO, I. 1998. Evaluación experimental del efecto de condiciones de estrés en la presentación de piscirickettsiosis en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- PLUMB, J.A. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University, Iowa.
- QUAGLIO, F. 1989. Infectious disease from birnavirus whit particular reference to infectious pancreatic necrosis of salmonids. *Riv. Ital. Acquacol.* 24: 167-179.
- ROBERTS, F. J., C. J. SHEPHERD. 1980. Enfermedades de la trucha y del salmón. Ed. Acibia, Zaragoza.
- ROBERTS, R. 1989. Fish pathology. Ed. Baillière Tindall, London.
- ROJAS, M. 2000. Comparación de la virulencia entre tres aislados de *Piscirickettsia salmonis* en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- SALINAS, G. 1998. Efecto de la densidad poblacional sobre la presentación y transmisión horizontal de piscirickettsiosis en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas

- experimentalmente. Tesis, M.V., Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- SANCHEZ, V. 2003. Piscirickettsiosis: El desafío de mantener el control. *Aquanoticias Internacional* 80: 57-62.
- SAN MARTIN, C. 2001. Evaluación de una vacuna comercial para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- SCHÄFER, J.W., V. ALVARADO, R. ENRÍQUEZ, M. MONRÁS. 1990. The coho salmon syndrome (CSS): A new disease in Chilean salmon, reared in sea water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10: 130.
- SMAIL, D.A., R.J. GRIERSON, A.L. MUNRO. 1986. Infectious pancreatic necrosis virus persistence in farmed Atlantic salmon: virulence studies and sub-clinical effects with respect to growth, smolting performance and condition. In: International Council for Exploration of the Sea. pp.8
- SMITH, P.A., C.N. LANNAN, L.H. GARCÉS, M. JARPA, J. LARENAS, P. CASWELL-RENO, M. WHIPPLE, J.L. FRYER. 1995. Piscirickettsiosis: A bacterin field trial in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 15: 137 - 141.
- SMITH, P.A., I.M. VECCHIOLA, S. OYANEDEL, L.H. GARCÉS, J. LARENAS, J. CONTRERAS. 1996. Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 16: 164-168.
- SMITH, P.A., J.R. CONTRERAS, J. LARENAS, J.C. AGUILLON, L. GARCÉS, B. PEREZ, J.L. FRYER. 1997. Immunization with bacterial antigens: Piscirickettsiosis. *Fish Vaccinology.* 90: 161-166.
- STANGELAND, K., S. HOIE, T. TAKSDAL. 1996. Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts. *J. Fish Dis.* 19: 323-327.
- STOSKOPF, M. 1992. Fish Medicine. Ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- TAKSDAL, T., K. STANGELAND, B.H. DANNEVIG. 1997. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon, *Salmo salar* and Brook trout *Salvelinus fontinalis* by bath challenge of fry with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp. *Dis. Aquat. Org.* 28: 39-44.
- TAKSDAL, T., A. RAMSTAD, K. STANGELAND, B. DANNEVIG. 1998. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L.,

post-smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *J. Fish Dis.* 21: 193-204.

TAKSDAL , T. 1999. Infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic Salmon: Infection trials pathogenesis and diagnostic methods. Thesis for the degree of dr. med. vet. Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Norway.

TATNER, M.F., M.J. MANNING. 1985. The ontogenic development of the reticulo-endothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 8: 189-195.

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

ANEXO N°1

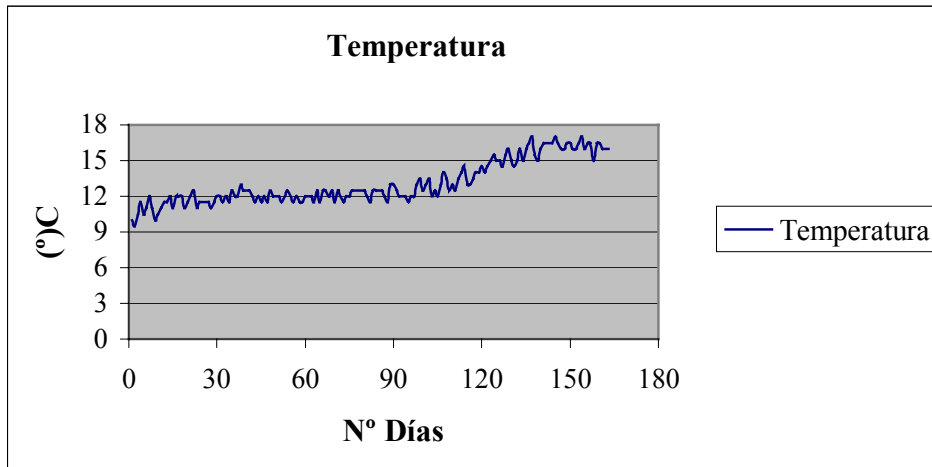
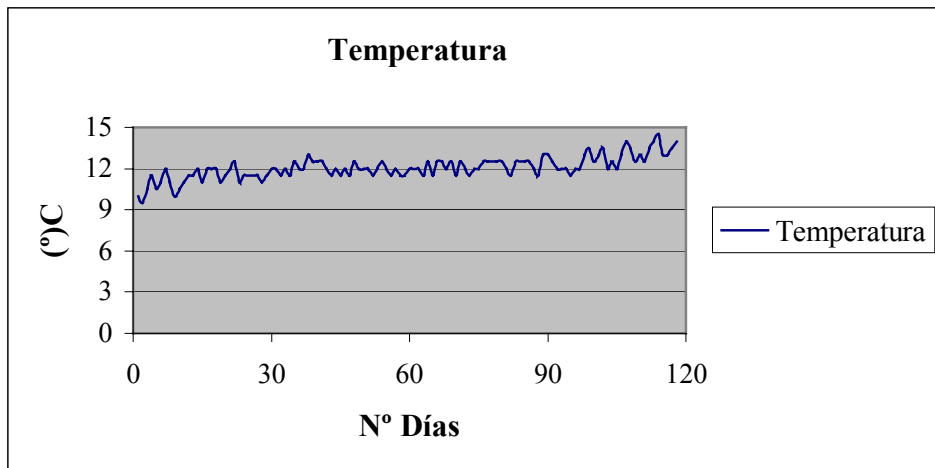
Mediciones de algunos parámetros del agua durante el periodo post vacunación.

Semanas Post vacunación	Estanque	O ₂ (>8mg/l)	DBO ₅ (mg/l)	pH (>5,5 y <8)
1 semana	Vacunado	9,5	1,0	5,9
	No vacunado	9,0	1,6	6,0
3 semana	Vacunado	10,1	1,9	5,8
	No vacunado	9,9	2,0	6,0
5 semana	Vacunado	9,4	1,4	5,9
	No vacunado	9,6	2,1	6,1
7 semana	Vacunado	10,2	1,9	6,0
	No vacunado	9,1	1,8	6,1
9 semana	Vacunado	9,7	1,8	6,0
	No vacunado	9,5	1,8	6,0
11 semana	Vacunado	10,3	2,3	6,0
	No vacunado	9,6	2,0	6,1
13 semana	Vacunado	9,9	1,6	5,9
	No vacunado	9,8	2,1	6,0
15 semana	Vacunado	10,3	2,2	6,0
	No vacunado	9,6	2,1	6,1
17 semana	Vacunado	10,1	2,1	5,9
	No vacunado	9,5	2,1	5,9
19 semana	Vacunado	9,8	1,9	5,9
	No vacunado	9,6	2,0	6,0
21 semana	Vacunado	9,7	2,0	5,8
	No vacunado	9,8	2,1	5,9
23 semana	Vacunado	9,9	1,8	6,0
	No vacunado	9,8	1,9	6,0
25 semana	Vacunado	10,1	2,1	6,0
	No vacunado	9,9	2,1	5,9

- Las muestras de agua para las mediciones de los peces vacunados de los estanques 1 y 2 se tomaron al azar.

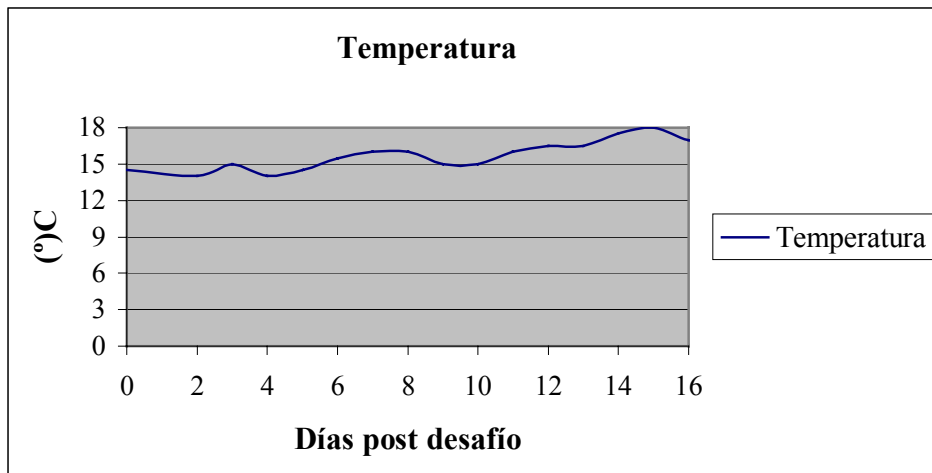
ANEXO N°2

Variaciones diarias de temperatura del agua en el periodo post vacunación para los peces utilizados en el desafío con *P. salmonis* (grafico superior) e IPNV (grafico inferior).



ANEXO N°3

Variaciones diarias de la temperatura del agua post desafío con *P. salmonis*.



Mediciones de algunos parámetros del agua post desafío con *P. salmonis*.

Semanas (p.i)	Acuario	O ₂ (>8mg/l)	DBO ₅ (mg/l)	pH (>5,5 y <8)
1 semana	Vacunado	8,5	3,7	7,1
	No vacunado	8,5	3,5	7,2
2 semana	Vacunado	8,0	4,8	7,1
	No vacunado	8,3	4,3	7,0

- Las muestras de agua para las mediciones, se tomaron una de cada grupo (vacunado y no vacunado) al azar.

ANEXO N°4

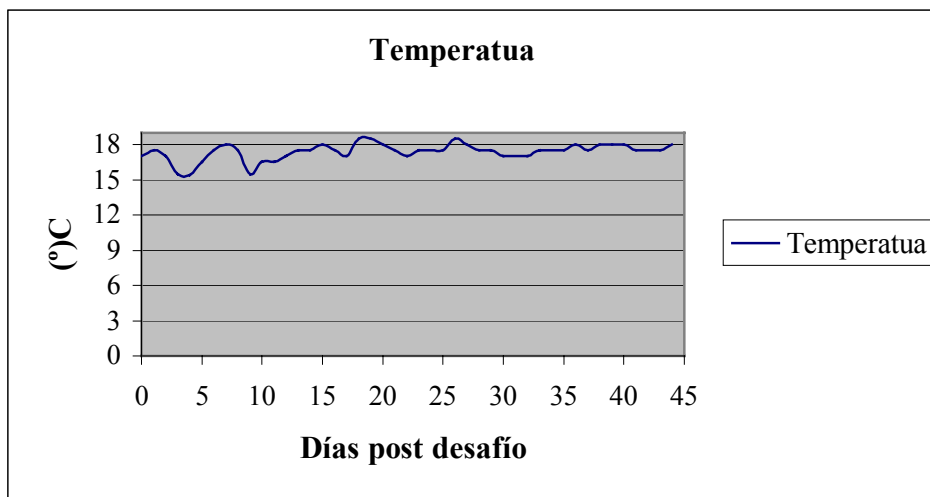
Tabla resumen de la mortalidad diaria en los acuarios en duplicado de *S. Atlántico* vacunados y no vacunados post desafío i.p. con cepa R-29 de *P. salmonis*, en agua de mar.

Días (p.i.)	Vacunados								No vacunados			
	A1		A2*		B1		B2*		C1		C2*	
	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%
6	2/2	5,7	1/1	2,8	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	1/1	2,8
7	23/25	71,4	22/23	65,7	13/13	37,1	15/15	42,8	21/21	60,0	13/14	40
8	10/35	100	11/34	97,1	18/31	88,5	19/34	97,1	14/35	100	21/35	100
9	0/35	100	1/35	100	1/32	91,4	0/34	97,1	0/35	100	0/35	100
12	0/35	100	0/35	100	2/34	97,1	1/35	100	0/35	100	0/35	100
14	0/35	100	0/35	100	1/35	100	0/35	100	0/35	100	0/35	100
Total	35	100	35	100	35	100	35	100	35	100	35	100

* corresponde a los duplicados de los acuarios.

ANEXO N°5

Variaciones diarias de la temperatura del agua post desafío con IPNV.



Mediciones de algunos parámetros del agua post desafío con IPNV.

Semanas (p.i)	Acuario	O ₂ (>8mg/l)	DBO ₅ (mg/l)	pH (>5,5 y <8)
1 semana	Vacunado	8,3	2,8	7,1
	No vacunado	8,5	3,2	6,8
2 semana	Vacunado	8,1	5,8	7,4
	No vacunado	8,3	4,2	7,2
3 semana	Vacunado	7,8	2,8	7,1
	No vacunado	8,2	3,8	7,2
4 semana	Vacunado	8,3	4,5	7,3
	No vacunado	8,4	4,3	7,4
5 semana	Vacunado	8,1	3,6	7,2
	No vacunado	8,2	4,3	6,9
6 semana	Vacunado	8,3	4,5	7,0
	No vacunado	8,1	4,6	7,2

- Las muestras de agua para las mediciones, se tomaron una de cada grupo (vacunado y no vacunado) al azar.

ANEXO N°6

Tabla resumen de la mortalidad diaria en los acuarios en duplicado de S. Atlántico vacunados y no vacunados post desafío i.p. con serotipo Sp de IPNV, en agua de mar.

Días (p.i.)	Vacunados								No vacunados			
	A1		A2*		B1		B2*		C1		C2*	
	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%
3	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	2/2	5,71	0/0	0,00
4	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	2/2	11,42	1/1	2,85
6	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/4	11,42	1/2	5,71
7	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	1/5	14,28	1/3	8,57
8	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/5	14,28	1/4	11,42
12	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/5	14,28	1/5	14,28
14	0/0	0,00	1/1	2,85	0/0	0,00	0/0	0,00	0/5	14,28	2/7	20,00
24	0/0	0,00	0/1	2,85	0/0	0,00	0/0	0,00	0/5	14,28	0/7	20,00
26	0/0	0,00	0/1	2,85	0/0	0,00	0/0	0,00	1/6	17,14	0/7	20,00
31	0/0	0,00	0/1	2,85	0/0	0,00	0/0	0,00	1/7	20,00	0/7	20,00
34	0/0	0,00	0/1	2,85	0/0	0,00	1/1	2,85	2/9	25,71	0/7	20,00
36	0/0	0,00	0/1	2,85	1/1	2,85	0/1	2,85	0/9	25,71	0/7	20,00
37	1/1	2,85	0/1	2,85	0/1	2,85	0/1	2,85	0/9	25,71	0/7	20,00
40	0/1	2,85	0/1	2,85	0/1	2,85	1/2	5,71	0/9	25,71	1/8	22,85
42	0/1	2,85	0/1	2,85	0/1	2,85	0/2	5,71	0/9	25,71	1/9	25,71
Total	1	2,85	1	2,85	1	2,85	2	5,71	9	25,71	9	25,71

* corresponde a los duplicados de los acuarios.

ANEXO N°7

TECNICA IFAT-SRS

- 1.- Desgrasar los portaobjetos en acetona durante 10 minutos y secar al aire.
- 2.- Extender la muestra renal sobre el portaobjetos.
- 3.- Secar al aire las muestras y fijarlas en acetona por 5 minutos.
- 4.- Depositar una o dos gotas de la dilución de trabajo (10^3 en PBS) del anticuerpo anti-P.salmonis de conejo e incubar en una cámara húmeda por 60 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Lavar las muestras con PBS (pH 7,0) y luego sumergirlos en el mismo PBS por 5 minutos.
- 6.- Aplicar una o dos gotas de la dilución de trabajo del segundo anticuerpo anti-anti P.salmonis-FITC (Sigma) e incubar en cámara humeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Lavar las muestras por 10 minutos en agitación con PBS (pH 7,0).
- 8.- Mantener por 15 segundos las muestras en la tinción de contraste azul de Evans (0,1 % en PBS).
- 9.- Lavar con PBS (pH 7,0) y luego sumergirlos en el mismo PBS por 5 minutos.
- 10.- Agregar una gota de fluido de montaje (pH 8,6) y tapar con cubreobjeto.
- 11.- Ver la muestra usando aceite de inmersión en un microscopio de fluorescencia.

ANEXO N°8

TECNICA IFAT-IPNV

- 1.- Fijación: el tapiz celular se fija con ayuda de una solución de isopropanol. Eliminar el medio de cultivo y añadir 500ul de medio de fijación por pocillo. Incubar el preparado durante 20 minutos a 4° C y a continuación eliminar este medio.
- 2.- Lavado de la placa: distribuir 1 ml de solución de lavado en cada pocillo, esperar unos minutos y retirar la solución, repetir esta operación.
- 3.- Adición del anticuerpo monoclonal: antes de iniciar el test, diluir la solución principal 20 veces con la ayuda de la solución de lavado 1 vez concentrada. Distribuir la solución diluida monoclonal de anticuerpos a razón de 200 ul por pocillo e incubar el preparado una hora a temperatura ambiente.
- 4.- Lavado de la placa: según lo señalado en paso 2.
- 5.- Adición del conjugado: antes de iniciar el test, diluir la solución madre 20 veces con la ayuda de la solución de la dilución del conjugado. Distribuir la solución diluida de la muestra a razón de 200 ug por cavidad e incubar la lámina 1 hora a temperatura ambiente.
- 6.- Lavado de la placa: repetir paso 2.
- 7.- Adición del medio de montaje: distribuir 500 ul de medio de montaje por pocillo.
- 8.- Lectura de los resultados: observar la placa con un microscopio de epifluorescencia. En el caso de presencia del IPNV en las muestras, se podrán observar que las células infectadas presentan una coloración citoplasmática verde fluorescente.

9. AGRADECIMIENTOS

- Es difícil expresar en tan pocas palabras los agradecimientos a mi familia que siempre me han apoyado y confiado en mí, muchas gracias padres y hermanos. A mis abuelos especialmente a Enrique y Raúl que no pudieron estar en este momento.
- Al Dr. Ricardo Enríquez muchas gracias por su confianza, disponibilidad apoyo y alegría.
- Al Laboratorio de Ictiopatología a la Sra. Mónica, Esteban, Cristian y Vania. Por sus consejos y ayuda en todo momento.
- A mis amigos de siempre... a ustedes mis agradecimientos son personales.
- A “Los Piratas” que hicieron tan grato mi paso por la Universidad.