

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

**“ESTUDIO DE SEGURIDAD DE DOS VACUNAS BIVALENTES
INYECTABLES PARA LA PREVENCIÓN DE LA NECROSIS PANCREÁTICA
INFECCIOSA (IPN) Y DE LA PISCIRICKETTSIOSIS (SRS) EN SALMONES DEL
ATLÁNTICO (*Salmo salar*).”**

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

JORGE LUIS LEAL AGUILAR

VALDIVIA – CHILE

2003

ÍNDICE

PÁGINAS

| | |
|-----------------------|----|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 10 |
| 5. RESULTADOS | 13 |
| 6. DISCUSIÓN | 19 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 23 |
| 8. ANEXOS | 27 |

PROFESOR PATROCINANTE: DR. RICARDO ENRÍQUEZ S. _____
Firma

PROFESORES CALIFICADORES: DR. ENRIQUE PAREDES H. _____
Firma

DR. HUGO FOLCH V. _____
Firma

FECHA DE APROBACIÓN: _____

1. RESUMEN

“Estudio de seguridad de dos vacunas bivalentes inyectables para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y de la Piscirickettsiosis (SRS) en salmones del Atlántico (*Salmo salar*).”

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y la Piscirickettsiosis, son las dos enfermedades infecciosas más importantes en la industria salmonera nacional, causando cuantiosas pérdidas económicas en peces jóvenes y de engorda. Estas enfermedades son causadas por un virus (*Aquabirnavirus*) y por una bacteria (*Piscirickettsia salmonis*), respectivamente. Uno de los sistemas más eficientes de prevención de enfermedades causadas por agentes intracelulares en salmonídeos es la vacunación utilizando la vía intraperitoneal. Las vacunas para aumentar su efecto protector utilizan adyuvantes que por su acción producen una reacción inflamatoria intraabdominal que ayuda a estimular al sistema inmune, generando así una mayor y prolongada respuesta antigénica.

Se evaluó la seguridad de dos vacunas bivalentes experimentales para IPN/SRS en agua de mar, utilizando la vía intraperitoneal. Se utilizaron 360 ejemplares divididos en ocho grupos de 35 peces y dos grupos controles de 40 peces. Se vacunaron dos grupos con la vacuna experimental “A” en dosis de aplicación (0,2ml) y otros dos grupos con el doble de la dosis (0,4ml). Con la vacuna “B” se procedió de la misma forma (0,2 y 0,4ml). Los dos grupos controles fueron inoculados (0,2 y 0,4ml) con solución fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Se controló la mortalidad diaria y luego de 30 días (450 UTA) se realizó la necropsia de los peces de todos los grupos para evaluar los hallazgos intraabdominales según la tabla de Speilberg. La temperatura del agua fue de 15°C promedio durante el experimento.

Los grupos vacunados no registraron mortalidad atribuible a las vacunas. La clasificación de Speilberg muestra que en los grupos de peces vacunados con la vacuna “A” se registró un rango de 0 a 3 puntos en la escala (moderadas adherencias, incluyendo partes más craneales de la cavidad abdominal, involucrando parcialmente partes de ciegos pilóricos e hígado conectados a la pared abdominal), observándose además restos de vacuna y pigmentación (melanosis) y en los grupos de peces vacunados con la vacuna “B” se registró un rango de 0 a 2 puntos en la escala de Speilberg. A diferencia de los peces de los grupos controles que no registraron adherencias.

Basado en los resultados obtenidos se concluye que las vacunas experimentales evaluadas con un puntaje máximo de 3 en la escala de Speilberg están dentro de los rangos normales, son aptas y no producen daño en la aplicación para los salmonídeos.

Palabras claves: Vacuna bivalente intraperitoneal, seguridad, Salmón Atlántico.

2. SUMMARY

“Safety study of two injectable bivalent vaccines for the prevention of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) and Piscirickettsiosis (SRS) in Atlantic salmon (*Salmo salar*).”

Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) and Piscirickettsiosis, are two of the most important infectious diseases in the Chilean salmon industry which cause high economic losses in juvenile and preharvested fish. These infections are caused by a virus (*Aquabirnavirus*) and by a bacteria (*Piscirickettsia salmonis*) respectively. One of the most efficient systems to prevent diseases caused by intracellular agents in salmonids is intraperitoneal vaccination. Vaccines, to increase their protective effect, use adjuvants which produce intra-abdominal inflammation which help to stimulate the immune system generating a higher and longer antigenic response.

The security of two experimental bivalent vaccines for IPN/SRS in salt water was evaluated using the intraperitoneal via. Three hundred and sixty fish, divided into eight groups of thirty-five individuals and two control groups of forty fish were used. Two groups were vaccinated with experimental vaccine “A” with normal application doses (0.2 ml). Another two groups were vaccinated with double the normal application dose (0.4ml). The same procedure was carried out for the other four groups with vaccine “B”. The two control groups were inoculated (0.2 and 0.4ml) with a sterile physiological solution (NaCl 0.9%). Mortality was controlled daily and, after 30 days, (450 UTA). Necropsy of the fish was performed to evaluate intra-abdominal lesions according to Spielberg’s table. Water temperature was 15°C, average, during the experiment.

Groups which received vaccination showed no deaths related to the vaccines. Spielberg’s classification showed that the groups of vaccinated fish with vaccine “A” ranged from 0 to 3 points in the scale (moderate adhesions including more cranial parts of the abdominal cavity, partly involving pyloric caeca and liver connected to the abdominal wall) as well as remains of the vaccine and pigmentation (melanosis) and the groups of fish vaccinated with vaccine “B” ranged 0 to 2 points in the Spielberg’s classification, compared with the control group of fish that showed no adhesions at all.

Based on the results obtained, it is concluded that the vaccines evaluated showed score 3 in the Spielberg’s scale, which is between the average range for this kind of products and also indicate that the vaccines are suitable and do not produce harm when applied to salmonids

Key words: Intraperitoneal bivalent vaccine, security, Atlantic salmon

3. INTRODUCCIÓN

Las óptimas condiciones hidrobiológicas para la producción de salmones como la calidad del agua, temperatura y el resguardo de los sitios de producción a las malas condiciones climáticas, que presentan las Regiones X, XI y XII, han contribuido al desarrollo de la salmonicultura nacional, colocando actualmente a Chile como el segundo productor mundial en este rubro (Méndez, 1998; Lozano, 2001).

El progresivo aumento que ha tenido la industria del salmón en estos últimos años, conlleva controles de tipo sanitario estrictos, ya que han surgido nuevas enfermedades bacterianas y virales. Estas últimas son las más importantes por su difícil control y diagnóstico, su carácter agudo o subagudo, lo que trae consigo una fuerte pérdida para la industria salmonera (Sano, 1995).

Mientras mayor es la explotación intensiva aumenta también el riesgo de contraer enfermedades infecciosas, afectando principalmente a ejemplares jóvenes, lo cual puede ocurrir en las diferentes etapas del ciclo de producción en agua dulce (de Kinkelin y col., 1991). Se ha estimado que el 10% de las especies en cultivo se pierden como resultado de enfermedades infecciosas (Leong y Fryer, 1993).

3.1 Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), es una enfermedad viral de tipo agudo o subagudo, altamente contagiosa que afecta a salmónidos jóvenes. Esta enfermedad afecta a los peces en estado de alevinaje pero también puede presentarse en los centros de engorda (Post, 1983; Roberts, 1989).

IPN fue el primer virus de peces que se aisló en el año 1955, después de encontrar las primeras lesiones pancreáticas atribuyéndoselas a un agente viral (Wolf, 1988).

Este virus pertenece a la familia de los Birnavirus y al género *Aquabirnavirus* (Murphy y col., 1995). Posee forma icosaédrica, tiene 58 a 60 nm de diámetro y un peso molecular entre 55×10^6 a 81×10^6 KD. La cápside se compone de 180 subunidades estructurales triangulares constituidas dentro de 92 unidades pentagonales y hexagonales. Su genoma está constituido por dos segmentos de RNA de doble cadena (Quaglio, 1989).

Existen nueve serotipos que varían en su virulencia, los más comunes en Europa son el Ab y Sp, siendo este último el más patógeno. En América del Norte es el VR299. En Chile por ser importador de ovas desde ambos continentes, posee los dos serotipos patógenos, detectándose en la X y XI Región con mayor prevalencia el serotipo europeo (Bustos y col., 1999).

En Chile el virus fue aislado por primera vez en truchas Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), en el año 1983. Se cree que el virus IPN fue introducido por las importaciones de ovas procedentes de Norteamérica (Mc Allister y Reyes, 1984). No se tuvieron registros durante diez años, presentándose en forma cotidiana desde 1994 en adelante. Su distribución abarca las zonas donde se produce salmón (X y XI Región) (Bravo, 1999).

La forma de transmisión puede ser vertical a través de las ovas u horizontal, registrando porcentajes de mortalidad de alrededor de 1,6% - 16% semanal en agua dulce y de 6% a 40% acumulado en el mar (Bustos y col., 1999)

El virus IPN se replica en el citoplasma a una temperatura de 10-26°C, mal a 4°C y no hay replicación a 30°C (Stoskopf, 1993). El virus puede ser aislado en peces portadores desde la parte anterior del riñón, bazo, hígado, ciegos pilóricos, cerebro y gónadas. Es eliminado por líquido seminal, ovárico y por las heces (Quaglio, 1989).

Los signos clínicos externos son: el pez se torna oscuro en la zona dorsal, con cierto grado de exoftalmia, distensión abdominal, petequias en la zona ventral y aletas ventrales, branquias pálidas y pseudofecas (Wolf, 1988). También hay cambios de comportamiento como torneo alternado con postración, natación en rotación sobre su eje longitudinal con movimientos lentos y débiles o rápidos y frenéticos (Wolf, 1988).

Los signos internos son: palidez de riñón, bazo, hígado, corazón, el tracto digestivo se encuentra sin alimento y con presencia de mucus lechoso claro (Wolf, 1988).

Los hallazgos histopatológicos son una marcada necrosis pancreática, cambios de coloración en el tejido adiposo adyacente, hematopoyético, intestino e hígado. En los acinos pancreáticos las células se encuentran con núcleo picnótico e inclusiones citoplasmáticas basófilas que no son cuerpos de inclusión reales, sino provocadas por el rompimiento celular; además, necrosis del hígado y degeneración hialina del músculo esquelético (Wolf, 1988).

El diagnóstico no es certero por los signos clínicos. Es necesario realizar un examen histológico y más específicamente el aislamiento del virus o por pruebas serológicas como: Fijación de complemento, Seroneutralización, Hemoaglutinación, Inmunofluorescencia y ELISA (Quaglio, 1989).

Otro medio para detectar el virus puede ser la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), que es de importancia cuando los microorganismos son de difícil desarrollo *in vivo*, esta técnica se está usando en los últimos años y permite detectar el virus en riñón, bazo, fluido celómico y ovas, así como en la sangre de los portadores asintomáticos (Oliveira, 1999).

La prevención y control es muy difícil, ya que el virus es cosmopolita y resistente al medio ambiente, por eso en el control se recomienda la eliminación de los peces infectados. Para efectos de la importación de ovas, se requiere un certificado sanitario de un organismo competente del país de origen de éstas, garantizando la ausencia del virus (Quaglio, 1989).

La profilaxis se realiza mediante vacunación, aplicación de medidas zoonosanitarias y la elección de líneas de peces genéticamente resistentes al virus IPN (Bustos y col., 1999).

3.2 Piscirickettsiosis (SRS)

Los primeros brotes se presentaron en 1989 en la zona de los canales de Huito y Caicaén en la comuna de Calbuco provincia de Llanquihue X Región (Bravo y Campos, 1989a). Inicialmente fue descrita en salmón Coho, pero pronto fueron afectadas las demás especies cultivadas en Chile, llegando a producir hasta un 90 % de mortalidad en algunos centros (Bravo y Campos, 1989b; Fryer y col., 1990).

La *Piscirickettsia salmonis* es la primera rickettsia aislada de un poiquilotermo acuático y es el agente causal de la Piscirickettsiosis (SRS). Su posición taxonómica fue establecida por Fryer y col. (1992) ubicándola en el orden Rickettsiales y familia Rickettsiaceae, tribu Ehrlichiae.

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 salmones de diferentes áreas geográficas (Fryer y Lannan, 1994).

El microorganismo es intracelular obligado, Gram negativo, inmóvil, no encapsulado, pleomórfico, habitualmente cocoide con un tamaño variable entre 0,5 – 1,5 μm de diámetro (Fryer y col., 1990; Cvitanich y col., 1991). Su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra entre los 15 y 18° C, disminuyendo marcadamente su replicación bajo 10° C y sobre 21° C (Fryer y col., 1990).

La enfermedad ha sido descrita principalmente en agua de mar y estuarina (Bravo y Campos, 1989 a y b; Branson y Díaz-Muñoz, 1991) y muy ocasionalmente en agua dulce (Bravo, 1994; Gaggero y col., 1995).

La enfermedad natural se presenta 6 a 12 semanas después del ingreso de los “smolts” al mar (Alvarado y col., 1990; Cvitanich y col., 1991).

La transmisión de la enfermedad puede ser horizontal por el contacto y la alta densidad que hay en cada jaula, presentándose generalmente en los meses de otoño y primavera con temperaturas promedio de 13° C (Lannan y Fryer, 1994). Smith y col., (1998) en forma experimental demostraron que *P. salmonis* puede penetrar la piel sin lesiones y branquias en los peces. Bustos (1993) y Larenas y col. (1996) realizaron experimentos en los que lograron la infección de alevines provenientes de ovas de reproductores machos y/o hembras positivos.

Los signos clínicos de la enfermedad se manifiestan con oscurecimiento de la piel, letargia y tendencia a nadar cerca de la superficie o junto a las redes de la jaula. Además, se ha descrito anorexia, exoftalmia, palidez branquial, lesiones de la piel que pueden derivar en úlceras, hemorragias petequiales y equimóticas en la base de las aletas (Bravo y Campos,

1989 a y b; Cubillos y col., 1990; Branson y Díaz-Muñoz, 1991). Internamente se observa ascitis, petequias en la grasa visceral, vejiga natatoria y tracto gastrointestinal. El bazo, riñón e hígado presentan signos de inflamación, el hematocrito refleja una severa anemia (Bravo y Campos, 1989 a y b; Alvarado y col., 1990; Schäfer y col., 1990; Branson y Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich y col., 1991).

Desde el punto de vista histopatológico, las principales lesiones corresponden a necrosis en los diversos órganos y tejidos, siendo los más afectados riñón, hígado, bazo e intestino. Es posible observar lesiones vasculares, inflamación perivascular, pericarditis, endocarditis, además, se pueden encontrar macrófagos conteniendo microorganismos tipo rickettsias dentro del citoplasma (Cubillos y col., 1990; Cvitanich y col., 1991; Branson y Díaz-Muñoz, 1991; Larenas y col., 1995).

El método de diagnóstico presuntivo consiste en frotis en fresco y cortes histológicos de tejidos afectados teñidos con Gram, hematoxilina-eosina o giemsa, naranja de acridina y azul de toluidina (Bravo y Campos, 1989b; Cubillos y col., 1990; Garcés y col., 1991; Lannan y Fryer, 1991; Larenas y col., 1995), observándose al microorganismo dentro de vacuolas citoplasmáticas rodeadas por una membrana (Fryer y col., 1990; Cvitanich y col., 1991). Debido a que estas técnicas son poco específicas, en cantidades bajas el organismo no es detectado en cantidades bajas (Lannan y Fryer 1991).

El diagnóstico confirmativo es por medio de la inoculación de líneas celulares con tejido renal proveniente de peces infectados (Fryer y col., 1990; Cvitanich y col., 1991). El inconveniente de éste método es que debe usarse sin antibióticos debido a la sensibilidad de la rickettsia y también por que se requiere de varias semanas para su aislamiento (Fryer y Mael, 1997).

Otro método para detectar la *P. salmonis* es a través de Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT) desarrollado por Lannan y Fryer (1991), siendo uno de los métodos más sensibles y específicos para el diagnóstico de SRS. Otros métodos son ELISA y Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) (Mael y col., 1996) que permiten detectar *P. salmonis* desde tejidos de portadores asintomáticos o de los enfermos por otros agentes. Estos procedimientos son rápidos y específicos y altamente sensibles.

La prevención y control se basa en disminuir el estrés de los peces, disminuyendo la densidad en las jaulas y eliminando los peces clínicamente enfermos, puesto que estos eliminan el microorganismo por las heces, orina y bilis (Salinas y col., 1997). Otra medida es el chequeo sanitario de todos los reproductores mediante IFAT y/o ELISA con la eliminación de ovas positivas (Bustos, 1993).

En la aplicación de antibióticos se utilizan estreptomycin, tetraciclina, gentamicina, oxitetraciclina (Fryer y col., 1990; Cvitanich y col., 1991), ácido oxolínico y flumequina se han usado oralmente para el control de brotes. Estos antibióticos no han sido capaces de controlar la enfermedad en forma efectiva, ya que en muchos casos se produce resistencia en

algunas cepas, producto de que se aplicaron en dosis bajas y en periodos cortos (Smith y col., 1996).

3.3 Vacunación en Peces

Los primeros intentos de vacunación en salmonídeos se realizaron en EEUU en el año 1930 para el control de Furunculosis, pero con el descubrimiento de los antibióticos en 1950 se perdió la importancia de la vacunación. El uso indiscriminado de antibióticos produjo una resistencia de los microorganismos, así como también la aparición de efectos adversos en los seres humanos, por los residuos que estos dejaban en la canal del animal y por los daños que provocaban al medio ambiente. Por esto, se empezó a retomar la vacunación como una medida correcta para realizar la profilaxis sin provocar daño al ser humano ni al medio ambiente (Carvajal, 2000).

Las vacunas, además de reducir la dependencia a los antibióticos, previenen la aparición de enfermedades que no pueden ser tratadas con sustancias antimicrobianas, reducen el impacto de infecciones crónicas y los peces tienen una tasa de crecimiento mayor que los enfermos, lo que incrementa la producción, también se produce una disminución de los portadores y por ende una reducción de la diseminación del agente. Además, no genera residuos en el pez y en el medio ambiente como en el caso de los antibióticos (Bravo, 2000), y producen una mayor defensa contra los agentes infecciosos generando una mayor formación de anticuerpos protectores (Bustos y col., 1999).

Según Horne (1997), existen métodos básicos de administración de vacunas en peces tales como:

Por inmersión: existen dos versiones de este método, una en que los peces se trasladan a un estanque cuya agua contiene la vacuna y otra variante donde el producto se añade al estanque de los peces. En ambos casos se expone a la superficie exterior de los peces la vacuna directamente diluida.

La inmersión es el método ideal para vacunar de manera masiva a los peces de menos de cinco gramos. Es el sistema con mejor relación costo-beneficio para peces con menos de diez gramos. No ocasiona estrés, la potencia no es tan alta como en el caso de la inyección y dificulta la entrega de los coadyuvantes. No resulta económico para peces grandes.

Por administración oral: en este caso se le agrega el antígeno al alimento, no es estresante permitiendo vacunar peces de cualquier tamaño pudiendo ser menos potente que los otros métodos. Hay menos gasto de personal o maquinaria para el procedimiento.

Por inyección: Primero se anestesia a los peces para facilitar su manejo y evitar el excesivo estrés. Se utiliza generalmente jeringas de multidosis. Los rangos de vacunación dependen del tamaño y peso de los salmones y destreza del equipo que lo haga, llegando a vacunar de 600-700 peces por hora/operador.

Durante largo tiempo han existido vacunas de primera generación a base de bacterinas y virinas (bacterias o virus inactivados), que confieren inmunización a los peces. Incluso se esta entrando al campo de la ingeniería genética con el desarrollo de vacunas recombinantes y de ADN, consideradas de segunda y tercera generación (Leong y Fryer, 1993; Rabinovich y col., 1994; Grayson y col., 1995; Alikin y col., 1996).

Las recombinantes combinan el material genético de un virus y la estructura sintética de otro microorganismo como levadura o bacteria. Las vacunas de tercera generación son más complejas, no requieren de un microorganismo para multiplicarse, ya que operan directamente sobre el pez. Se busca la secuencia del DNA que determina la creación del antígeno, igual que en el caso de las recombinantes, y este trozo o secuencia de DNA se inocula vía intramuscular, la célula del pez comienza a sintetizar la proteína o proteínas del antígeno y al salir de la célula se genera la respuesta inmune (Carvajal, 2000).

Estos estudios han permitido comprender mejor la interacción que se genera con su huésped y el medio ambiente que los rodea, y por consiguiente posibilita el establecimiento de medidas de control oportunas, actualmente traducidas en el desarrollo y uso de nuevas drogas (Carvajal, 2000).

Una vacuna para que actúe como tal debe otorgar inmunidad fuerte y prolongada, además de no causar efectos colaterales desfavorables. 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, 2002).

Las vacunas producen la inmunidad específica en los peces, lo que permite una buena protección a los agentes infecciosos, además no generan residuos en el pez y en el medio ambiente (Tizard, 2002). Por otra parte, existen otras formas para estimular la respuesta del sistema inmune, para así aumentar la protección de los peces contra las enfermedades. Dentro de éstos se encuentran los coadyuvantes y los inmunoestimulantes (Tizard, 2002).

Los coadyuvantes son sustancias que promueven la respuesta inmunitaria cuando se administran junto a los antígenos, actuando en forma de dar una lenta liberación del antígeno para así hacer más duradera la acción de la vacuna, estos coadyuvantes pueden ser sales de aluminio como hidróxido y fosfato. Estos se depositan en los tejidos formando un pequeño nódulo del cual se libera con lentitud los componentes en el organismo y suministra así un estímulo antigénico prolongado. Por otro lado los inmunoestimulantes no necesitan darse junto a los antígenos, sino más bien se administran para provocar una intensificación de la respuesta del sistema inmunitario que no es específica para un antígeno (Tizard, 2002).

Para evaluar la magnitud de efectos adversos provocados por las vacunas inyectables, se cuenta con la “escala de Spielberg”(Test de seguridad) con la cual se mide el grado de adherencias intraperitoneales post inoculación de un producto (Midtlyng y col., 1996), (Anexo 1), que valora de 0 a 6, el grado de severidad de la adherencia visceral y melanosis

provocado por este tipo de vacunación. También se mide en la prueba de seguridad la mortalidad diaria de los peces que fueron sometidos al ensayo (Bravo, 2000).

En Chile no se comercializan todas las formas de vacunas, es más, se venden como autovacunas y es por eso que aún los laboratorios no comercializan masivamente estos productos, ya que están en etapa de experimentación y no cuentan con la autorización correspondiente (la cual es otorgada por el SAG). En Chile existen vacunas de primera y segunda generación utilizando adyuvantes (Carvajal, 2000).

Actualmente se hacen estudios para determinar los resultados de las vacunas contra SRS e IPN, que todavía no se comercializan en forma masiva en el país. El positivo balance en la utilización de vacunas permite reducir significativamente la mortalidad, lo que implica menores costos para la producción y mayores ganancias. Además, permite también tener altos niveles de anticuerpos protectores y algo muy importante es que se logra disminuir la utilización de antibióticos en la producción salmonera (Carvajal, 2000).

En la actualidad existen vacunas para ambas enfermedades (IPN y SRS), donde para IPN tiene representación por los laboratorios farmacéuticos como Alpharma, AVL, Bayer S.A., Bios Chile, Intervet, Novartis, Recalcine, Veterquímica, encontrándose en su etapa experimental que son administradas con los métodos antes mencionados. En tanto para SRS hay dos vacunas inactivadas (bacterinas) que son Ricketvac Oleo[®] (Lab. Recalcine) y Vac-SRS[®] (Aquaculture S.A. Services and Research), las que sin embargo no han sido suficientemente documentadas en condiciones experimentales y de campo. De acuerdo a los fabricantes estas pueden conferir un índice de protección de hasta 71% (Bravo, 2000; Carvajal, 2000)

Los criterios requeridos para la aplicación y aceptación de la licencia de una vacuna son: Test de potencia, seguridad y estabilidad (Horne y Ellis, 1988), de los cuales se aplicará el test de seguridad a los productos en prueba de este estudio.

El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de dos vacunas experimentales bivalentes inyectadas intraperitonealmente para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y de la Piscirickettsiosis (SRS) en dosis única y doble, donde se medirá el grado de adherencias.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 LUGAR Y CONDICIONES DEL ENSAYO

4.1.2 Lugar donde se desarrolló el experimento

La presente investigación se desarrolló en las salas de acuarios y estanques del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.1.3 Procedencia y peso de los peces

Se utilizaron 390 peces de la especie Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un peso promedio de 15 - 20 g obtenidos de una piscicultura ubicada en la IX Región en el sector de Villarrica-Pucón.

4.1.4 Aclimatización y chequeo sanitario

Los peces fueron aclimatados durante dos semanas en la sala de estanques del laboratorio en un estanque de mil litros con agua circulante proveniente de una vertiente, donde se le realizó un completo chequeo sanitario (bacteriológico, parasitológico y virológico) a 30 peces tomados al azar del total de ellos. Constatándose que fueron negativos a bacterias (*R. salmoninarum*, *P. salmonis*, *Flavobacterium sp.*), a agentes parasitarios (*Hexamita sp.*, *Ichthyophthirius multifiliis*) y a agentes virales citopatogénicos (IPN) según procedimientos de la O.I.E. (2000).

4.1.5 Mantención y alimentación de los peces

Los peces seleccionados se colocaron en diez acuarios de fibra de vidrio de 80x40 cm, con capacidad de 80 litros cada uno. Se utilizó agua de mar, obtenida de la caleta Los Molinos con una salinidad de 20 ‰ y se cambió dos veces por semana en un 80% de su totalidad.

Cada acuario esta compuesto de un sistema de aireación doble; un sistema mediante cinco bombas (una bomba cada dos acuarios) conectadas a la red eléctrica y otro sistema similar conectado a un equipo de emergencia en caso de corte de energía. Todo esto con la finalidad de incorporar oxigenación las 24 horas del día. Cada bomba posee dos salidas con dos mangueras donde se les colocó una piedra difusora para así surtir en forma homogénea el oxígeno.

Además los acuarios poseían un sistema de recirculación y filtración del agua por medio de filtros que utilizan perlón y carbón activado y que cumplían la función de filtrar los sólidos y de neutralizar los desechos metabólicos (NH₄, CO₂) respectivamente. Todos los filtros se limpiaban y desinfectaban una vez por semana.

La alimentación consistió en una dieta de mantención equivalente al 1% de su peso vivo de un concentrado comercial que se les repartía en dos partes, una por la mañana y otra en la tarde hasta completar el experimento.

Los peces se mantuvieron a una temperatura constante por medio de calefactores (uno por acuario), más un termostato que regulaba la temperatura a 14 -15° C durante las 24 horas.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y VACUNACIÓN

4.2.1 Diseño experimental

Una vez que se obtuvieron los resultados del chequeo sanitario se procedió a distribuir en 10 acuarios los 360 peces: 8 acuarios de 35 peces cada uno y 2 acuarios de 40 peces cada uno. Los grupos experimentales fueron inoculados intraperitonealmente con 0,2 (dosis de uso) y 0,4 ml (dosis doble) de vacuna prototipo “A” y 0,2 y 0,4 ml de vacuna prototipo “B” utilizando 35 peces cada uno. Los peces controles fueron todos inoculados con solución estéril de 0,2 y 0,4 ml de NaCl al 0,9%, utilizando 40 peces para cada uno (Tabla 1). Se suspendió la alimentación por 24 horas antes de la vacunación

Luego de la vacunación los peces fueron controlados hasta su completa recuperación, dejándoles en ayuno por otras 24 horas, para luego comenzar en forma paulatina la alimentación considerada al 1% de su peso vivo que requieren para su mantención. Esta alimentación se dio hasta el final del experimento.

Tabla N°1: Esquema del diseño experimental para el estudio de seguridad de dos vacunas bivalentes inyectables para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y de la Piscirickettsiosis (SRS) en Salmones del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g.

| ACUARIO | VACUNA | DOSIS | Nº PECES |
|--------------|---------|-------|------------|
| 1 | A | 0,2ml | 35 |
| 2 | A | 0,2ml | 35 |
| 3 | A | 0,4ml | 35 |
| 4 | A | 0,4ml | 35 |
| 5 | B | 0,2ml | 35 |
| 6 | B | 0,2ml | 35 |
| 7 | B | 0,4ml | 35 |
| 8 | B | 0,4ml | 35 |
| 9 | Control | 0,2ml | 40 |
| 10 | Control | 0,4ml | 40 |
| TOTAL | | | 360 |

4.2.2 Aplicación de la vacuna

El procedimiento de vacunación se realizó de la siguiente manera:

- Los peces previo ayuno de 24 horas se anestesiaron con Benzocaína (BZ-20^{®1}) (Etil p-aminobenzoato) en una concentración de 40mg/l y paralelamente se le inyectó oxígeno al agua.
- Posterior al efecto del anestésico se procedió a la vacunación de los grupos experimentales.
- Se utilizaron dos vacunas (A y B) prototipos bivalentes en forma oleosa en dosis única y doble (0,2 y 0,4ml) procedentes de una firma farmacéutica.
- Se procedió a vacunar en forma intraperitoneal insertando la aguja en la línea medio ventral, un largo de aleta anterior a las aletas pélvicas. Una vez vacunados se trasladaron a sus respectivos acuarios y se monitoreó su recuperación. Los peces controles se sometieron al mismo manejo, con la diferencia de que fueron inyectados con 0,2 y 0,4ml de solución fisiológica estéril (NaCl 0,9% P/V). Para una buena diferenciación, los acuarios fueron rotulados debidamente.

4.3 PRUEBA DE SEGURIDAD (ADHERENCIAS)

El experimento se extendió por un lapso de 450 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) (450°/día), el cual es el tiempo requerido para su absorción intraperitoneal según el laboratorio productor de dichas vacunas. El periodo que duró el experimento fue de treinta días, ya que se mantuvo una temperatura constante de 15° C/día (Anexo 3) con lo cual se acumularon 15 UTA diarias, hasta completar las 450 UTA. Luego de cumplidas las UTA se procedió al sacrificio de los peces con sobreexposición al anestésico BZ-20[®]. Posteriormente se pesaron (Anexo 2), para luego proceder con la necropsia de ellos, mediante observación directa y toma de fotografías para su evaluación y clasificación según la tabla de Speilberg (Anexo 1) y así determinar el grado de adherencias intraperitoneales originadas.

En todos los grupos de peces (vacunados y controles) se llevó el control de mortalidad diaria con la finalidad de establecer su clasificación según sus adherencias y hallazgos de necropsia. También se midieron los niveles de amonio y oxígeno disueltos en el agua, además de medir la salinidad en todos los acuarios al momento de cambiar el agua que se mantuvo en 20 ‰ durante el experimento.

Las necropsias se realizaron primeramente para los grupos vacunados hasta llegar a los dos grupos controles, donde se tomaron fotografías de los casos más representativos y así realizar la clasificación por cada pez y cada vacuna experimental.

¹Veterquímica camino a Melipilla 5641 Los Cerrillos Santiago, Chile.

5. RESULTADOS

5.1 PRUEBA DE SEGURIDAD

Durante el período de aclimatación (2 semanas) no se observó ninguna alteración significativa en la conducta de los peces, salvo un leve aumento del estrés (anorexia, natación anormal) producto de su reciente traslado. Los 30 peces muestreados al azar, resultaron negativos a las pruebas realizadas (chequeo sanitario).

Durante las primeras horas post vacunación se observó un cambio en el comportamiento normal de los peces, observándose más nerviosos. Ésta reacción es normal en los peces luego de un manejo como este.

5.1.2 Mortalidad

Producto de un corte de energía y falla de la bomba de oxigenación de emergencia un grupo de peces del ensayo de la vacuna "A" 0,2 ml fue eliminado. El resto de los grupos que llegaron al final del experimento se sacrificaron al cumplir las 450 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA), realizándose un examen clínico general y necropsia.

No se registró mortalidad atribuible a las vacunas bivalentes IPN/SRS en el transcurso de la prueba realizado por 30 días.

Durante el experimento la temperatura se midió diariamente la cual osciló entre los 12-18° C, obteniéndose un promedio para el estudio de 15° C (anexo 3).

5.1.3 Adherencias

Después de 30 días post inoculación, se sacrificaron los peces de dos acuarios por día. Los resultados de los hallazgos de la observación intraperitoneal en los peces, de acuerdo a la clasificación de Speilberg se presentan en la tabla N°3 (anexo1).

Tabla N° 2: Distribución del grado de adherencias intraabdominales posterior a la aplicación intraperitoneal de dos vacunas experimentales bivalentes para la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y la Piscirickettsiosis (SRS) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g mantenidos a 20 ‰ de salinidad y 15° C promedio.

| Clasificación de Speilberg | | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------------|---------|---------|--------|---|---|---|------------|
| Acuarios vacunados y controles | Grado de Adherencia | | | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Total |
| VACUNA "A" | | | | | | | | |
| Acuario 1 (0,2 ml) | *9/25,7 | 15/42,9 | 7/20,0 | 4/11,4 | | | | 35 |
| Acuario 2 (0,2 ml) | | | | | | | | |
| Acuario 3 (0,4 ml) | | 11/31,4 | 19/54,3 | 5/14,3 | | | | 35 |
| Acuario 4 (0,4 ml) | 4/11,4 | 10/28,6 | 15/42,9 | 6/17,1 | | | | 35 |
| VACUNA "B" | | | | | | | | |
| Acuario 5 (0,2 ml) | 17/48,6 | 12/34,3 | 6/17,1 | | | | | 35 |
| Acuario 6 (0,2 ml) | 10/28,6 | 19/54,3 | 6/17,1 | | | | | 35 |
| Acuario 7 (0,4 ml) | 2/5,8 | 20/57,1 | 13/37,1 | | | | | 35 |
| Acuario 8 (0,4 ml) | 2/5,8 | 19/54,3 | 14/40,0 | | | | | 35 |
| GRUPOS CONTROLES | | | | | | | | |
| Acuario 9 (0,2 ml) | 40/100 | | | | | | | 40 |
| Acuario 10 (0,4 ml) | 40/100 | | | | | | | 40 |
| TOTAL | | | | | | | | 325 |

* n° de peces/‰

Se observa que los peces del grupo control inoculados con solución fisiológica (0,2 y 0,4 ml) mostraron una clasificación de 0 (sin lesiones visibles). En el grupo de inoculados con la vacuna "A" (0,2 y 0,4 ml), se detectó un rango entre 0 y 3 en la clasificación de Speilberg (adherencias moderadas, involucrando parcialmente ciegos pilóricos, hígado o ventrículos, conectándolos a la pared abdominal), en cambio en el grupo de peces inoculados con la vacuna "B" (0,2 y 0,4 ml) se encontró un rango entre 0 y 2 grados.

No se observaron lesiones de mayor grado, pero si se detectó en los peces vacunados melanización (pigmentación) en la cavidad abdominal, además de restos de vacuna no absorbida en la cavidad abdominal luego de transcurridos 30 días post inoculación.

En las figuras N° 1, 2, 3, 4 se muestran algunos hallazgos intraabdominales que se tabularon anteriormente.



Figura N°1: Salmón del Atlántico inoculado i.p. con solución fisiológica (Nacl 0,9%), presentando grado de adherencia 0 según la escala de Speilberg.

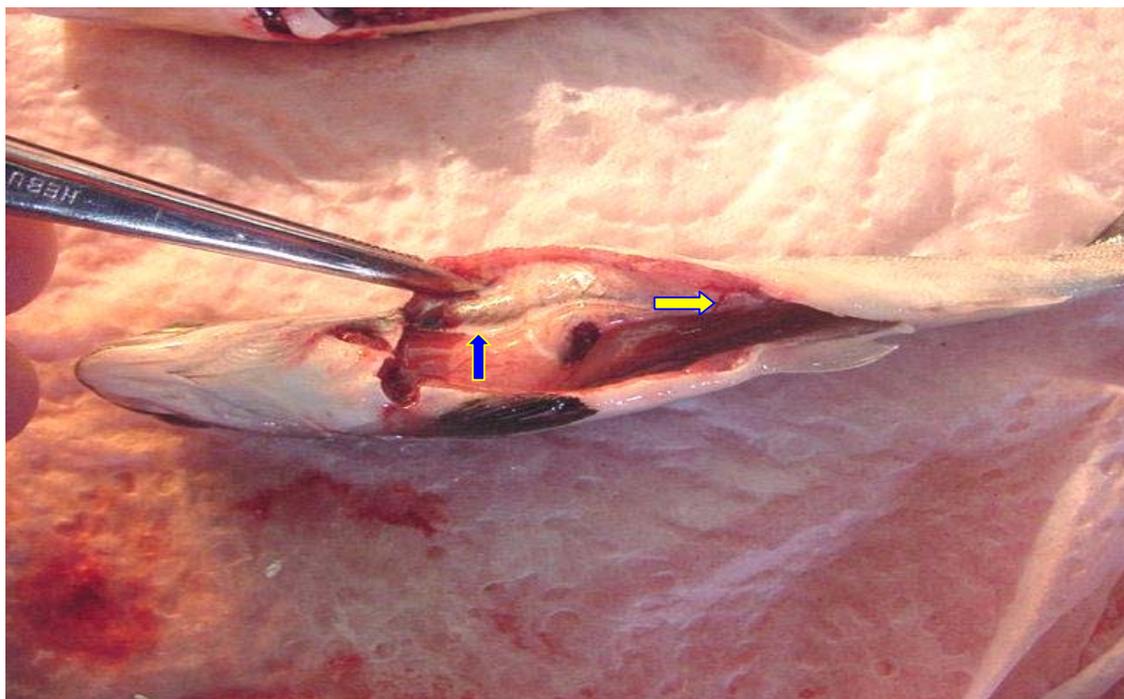


Figura N° 2: Salmón del Atlántico inoculado i.p. con 0,2ml de la vacuna “A”, presentando grado de adherencia 1 (flecha amarilla: unión intestino a pared abdominal) según la escala de Spielberg, además de restos del producto (flecha azul).



Figura N° 3: Salmón del Atlántico inoculado i.p. con 0,4ml de la vacuna “B”, presentando grado de adherencia 2 (flecha amarilla: unión del bazo a la pared abdominal) según la escala de Spielberg, además restos del producto (flecha azul).

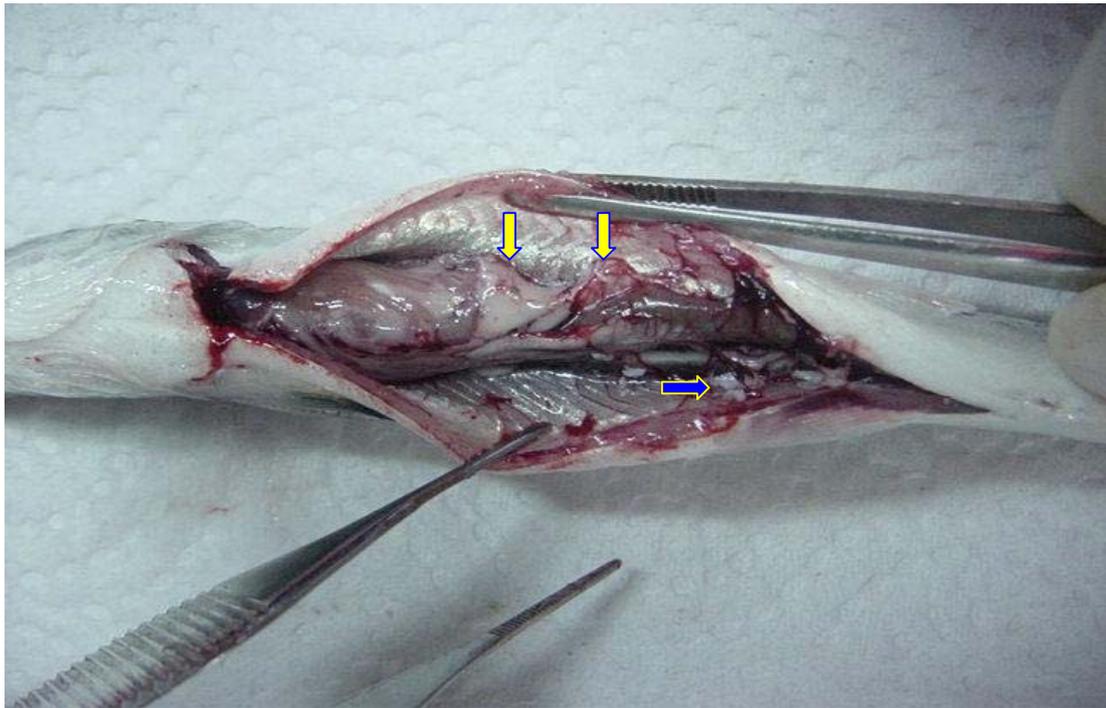


Figura N° 4: Salmón del Atlántico inoculado i.p. con 0,4ml de la vacuna “A”, presentando grado de adherencia 3 (flechas amarillas: unión de la pared abdominal con parte de los ciegos pilóricos e intestino) según la escala de Speilberg, además presentando melanosis en los tejidos y restos del producto (flecha azul).

6. DISCUSIÓN

Durante los últimos años en Chile, los agentes causales de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y de Piscirickettsiosis (SRS), se han diseminado con suma rapidez en los centros de cultivo de la X y XI Regiones, estimándose que un alto porcentaje de los salmones Atlántico (*Salmo salar*) son portadores de IPN y SRS (Bustos y col., 1999; Carvajal, 2000).

En peces salmónidos, se han llevado a cabo algunas investigaciones con el fin de encontrar nuevas formas de prevenir enfermedades como IPN, SRS y Furunculosis, entre otras. Entre estas medidas se encuentra la vacunación, las medidas zoonositarias y la elección de líneas de peces genéticamente resistentes a estas enfermedades que se describen como las formas de prevención más utilizadas en peces (Horne y Ellis, 1988; Alikin y col., 1996; Bustos y col., 1999).

Las vacunas para que puedan ser usadas en peces tienen que cumplir una serie de requisitos como ser de bajo costo, fáciles de producir, generar una buena respuesta inmune, que sean inocuas y lo más importante es que sea segura su aplicación y que no provoque daños internos en el pez (Carvajal, 2000).

En esta investigación se aplicó el test de seguridad, que según Midtlyng y col. (1996), permite verificar la inocuidad de una vacuna, a través de una evaluación de los efectos adversos que pueda producir el producto inyectado intraperitonealmente en el organismo del pez. Se consideró en el procedimiento un doble desafío, en el cual el pez fue expuesto también al doble de la dosis recomendada del producto (Horne y Ellis, 1988).

La vacunación se realizó por la vía de inoculación intraperitoneal (i.p.), la cual es la más usada en la industria salmonera, ya que el antígeno entra en contacto directo con los órganos de la cavidad abdominal y se produce su absorción inmediata porque es la ruta más potente de vacunación, permitiendo el uso de coadyuvante. Es el método con mejor relación costo-beneficio en peces grandes. Otros medios de vacunación (inmersión y alimentación) no generan el rango de respuesta adecuada para una inmunización prolongada (Horne, 1997; Carvajal, 2000).

A nivel mundial se dispone de máquinas semiautomáticas para vacunar peces intraperitonealmente. En Chile se utiliza el método manual. En la temporada 2001-2002 se vacunaron de esta forma aproximadamente 120 millones de pre-smolt de S. Atlántico. Es una labor intensa y provoca estrés en los peces de peso ligero (Horne, 1997; Carvajal, 2000).

Durante los treinta días post inoculación, producto de un corte de energía general que afectando al acuario N°2 se perdió el total de peces, por fallas en la bomba de oxigenación de

emergencia, esto significo que el grupo de la vacuna "A" en dosis de 0,2ml no tuvo réplica del experimento.

En los primeros días post inoculación se registró un aumento del estrés producto de la manipulación, provocando anorexia e intranquilidad, recuperándose en un par de días, lo que es completamente normal según Speilberg (2003), quien establece que debido al manejo es lógico que esto ocurra, incluso puede causar mortalidad de algunos peces.

Según la tabla de Speilberg, los grados más altos de lesiones entre las dos vacunas bivalentes fueron los de la vacuna "A" con 0,2 y 0,4 ml presentando también restos del producto y pigmentación (melanosis), llegando con un puntaje máximo de 3. Ninguno de los grupos de peces presentó niveles mayores (4, 5, 6), que son consideradas como graves y que determinan el rechazo del producto para la vacunación intraperitoneal de peces.

Los grupos controles (0,2 y 0,4 ml) inoculados con solución fisiológica estéril (NaCl 0,9%), considerando la escala de Speilberg fueron evaluados en rango 0, estableciéndose que no se generaron lesiones al momento de la aplicación y tampoco en la absorción de la solución fisiológica (NaCl 0,9%).

Las lesiones observadas en los distintos grupos de peces vacunados, se debe la respuesta inflamatoria del organismo frente a cuerpos extraños. El agente extraño que provoca éstas lesiones intraabdominales es el adyuvante que acompaña al inmunógeno. Trabajos realizados por Midtlyng y col. (1996), Poppe y Breck (1997) y Speilberg (2003), indican que las sustancias que contienen los adyuvantes tales como aceites minerales, sales de aluminio y derivados de levaduras, generan efectos adversos como adherencias en los tejidos internos del pez produciendo además, granulomas y algún grado de pigmentación (melanosis). Sin embargo, la incorporación de éstos adyuvantes en las vacunas ayuda a la estimulación del sistema inmune, creando pequeños focos en los tejidos del pez donde se libera lentamente el antígeno hacia todo el organismo (Speilberg, 2003).

Midtlyng y col. (1996) y Speilberg (2003), demuestran la inducción inmunológica prolongada por los distintos tipos de adyuvantes usados en la formulación de vacunas comerciales para peces, entre los que se destacan aceites minerales, sales de aluminio, Beta-1,3 glucano derivado de levaduras, que estimulan el desarrollo de una respuesta específica y no específica de las células T, neutrófilos y macrófagos, aumentando la capacidad fagocítica de estos últimos.

Como resultado de los efectos adversos provocados por los distintos tipos de adyuvantes, Poppe y Breck (1997) describen que se producen adherencias en distintos órganos de la cavidad abdominal siendo los más afectados los ciegos pilóricos, bazo, intestino y en menor medida hígado y ventrículos (pared abdominal), provocando alteraciones en su función biológica y del crecimiento del pez.

Midtlyng y Lillehoug (1998) y Speilberg (2003) demuestran una disminución en el crecimiento de los peces vacunados, además del daño de la canal del pez al momento de la

evisceración, provocando pérdidas económicas a la industria salmonera, debido a la vacunación intraperitoneal con adyuvantes demasiado irritantes.

Según Speilberg (2003), las lesiones encontradas en peces salmónidos inoculados intraperitonealmente, son reacciones normales pero sólo hasta cierto rango el cual oscila entre 2-3.

Speilberg (2003), indica que el grado de adherencias encontradas en los peces vacunados i.p. está directamente relacionado con la talla del pez y etapa de smoltificación (transformación parr-smolt) al momento de su vacunación. También hace referencia al peso mínimo deseable para vacunar en peces. Establece que entre 25 – 40 g es ideal, con un máximo de 60 g. En este estudio los peces fueron vacunados con un peso aproximado de 15-20 g. No produjo grandes problemas de estrés.

La temperatura del agua también puede hacer variar el grado de adherencias. Midtlyng y Lillehoug (1998) indican que una temperatura entre 12-15°C estimula la respuesta inmune y que sobre los 18°C se crea una situación de estrés mayor disminuyendo la respuesta inmune y creando mayores problemas de adherencias. En el caso de este estudio se controló la temperatura en forma constante y fluctuó entre 14-15°C (anexo3) por lo cual, este parámetro no influyó en el estudio.

Los mayores grados de lesiones encontradas en los peces vacunados fueron producidas por la dosis doble (0,4ml) de ambas vacunas experimentales (A y B), lo cual se explicaría por el mayor volumen de adyuvante inoculado. Sin embargo, se observó en la vacuna “A” un grado mayor de adherencias que con la vacuna “B”.

Poppe y Breck (1997) encontraron grandes diferencias en las lesiones entre diferentes centros de cultivo, al observar los llamados “efecto orilla” de la vacunación, indicando que factores de riesgo como la contaminación a través del agua e infecciones latentes o subclínicas, contribuyen a la variación de la frecuencia de las lesiones intraabdominales observadas.

Investigaciones de Midtlyng y col. (1996) y Speilberg (2003), recomiendan observar el grado de lesión en un período mayor (6-8 meses). En este estudio como se ajustó a un protocolo ya establecido, el experimento solo se realizó por un lapso de 30 días.

De lo expuesto anteriormente y considerando los objetivos del estudio se concluye que:

- Los prototipos de las dos vacunas bivalentes para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y de la Piscirickettsiosis (SRS) no producen mortalidad en *S. Atlántico* (*S. Salar*) de 15-20 g al ser inoculadas intraperitonealmente.
- El grado de adherencias encontrados (grado 0-3) no produce mayor lesión en la cavidad abdominal del pez, con lo cual no es de riesgo para su uso en esta especie.

- Las vacunas son aptas para la utilización en la industria salmonera nacional, debido que el estudio de seguridad hasta 30 días post vacunación demuestra que no provocan daños intraabdominales en los peces.
- Se observó en la vacuna “A” un grado mayor de adherencias que en la vacuna “B”.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALIKIN, Y. S., I. S. SHCHELKUNOV, T. I. SHCHELKUNOV, O. A. JUPINSKAYA, V. V. MASYCHEVA, V. P. KLIMENKO, V. A. FADINA. 1996. Prophylactic treatment of viral diseases in fish using native RNA linked to soluble and corpuscular carriers. *J. Fish Biol.* 49: 195- 205.
- ALVARADO V., W. SCHÄFER, R. ENRÍQUEZ, M. MONRÁS, V. CUBILLOS, C. FARIAS, A. ALBERDI. 1990. Síndrome del Salmón Coho (S.S.C.), nueva enfermedad de los salmonídeos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. *Patología Animal* 4: 10-13.
- BRANSON E. J., D. DÍAZ – MUÑOZ. 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *J. of 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 News.* 17: 3.
- BRAVO, S. 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 14: 137-138.
- BRAVO, S. 1999. Efectos del IPN en la acuicultura. *Chile Pesquero* 110: 54-55.
- BRAVO, S. 2000. Previendo las enfermedades en la industria salmonera. *Chile Acuicola:* 21-25.
- BUSTOS, P. 1993. Pérdidas por enfermedades bacterianas de salmónidos en Chile. *Aquanoticias Int.* 15: 4-13.
- BUSTOS, P., P. MIDTLYNG., C. MAIRA. 1999. IPN: Un enorme desafío para la industria salmonera. *Aquanoticias Int.* 48: 48-51.
- CARVAJAL, P. 2000. Industria creciente, vacunas para la salmonicultura. *Salmonoticias* 83: 11-15.
- CUBILLOS, V., C. FARIAS, A. ALBERDI, V. ALVARADO, J. 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. 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 S. A. Zaragoza, España.
- FRYER, J. L., C. N. LANNAN, L. H. GARCÉS, J. J. LARENAS, P. A. 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, S. J. GIOVANNONI, N.D. WOOD. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 120-126.
- FRYER, J. L., C. N. LANNAN. 1994. Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves, and crustaceans. *Zoological Studies* 33: 95-105.
- FRYER, J. L., M. J. MAUEL. 1997. The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish. *Emerging Infectious Dis.* 3: 137-144.
- 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.
- GARCÉS, 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.
- GRAYSON, T. H., A. J. EVENDEN, I. MARTIN, L. GILPIN, C. MUNN. 1995. production of the major antigen of *Renibacterium salmoninarum* in *Escherichia coli* K12. *Dis. Aquat. Org.* 22: 227-231.
- HORNE, M. T., A. E. ELLIS. 1988. Comercial production and licensing of vaccines. *Fish Vaccination* 4: 47-54.
- HORNE, M. T. 1997. Technical aspects of the administration of vaccines. *Fish Vaccinology* 90: 79-89.
- 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. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 17: 115-121.

- LARENAS, J. J., L. HIDALGO, H. GARCÉS, J. L. FRYER, P. SMITH. 1995. Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Avances en Ciencias Veterinarias* 10: 53-58.
- LARENAS, J. J., C. ASTORGA, J. CONTRERAS, H. GARCÉS, J. L. FRYER, P. SMITH. 1996. Rapid detection of *Piscirickettsia salmonis* using microwave irradiation. *Fish Pathology* 31: 231-232.
- LEONG, J. C., J. L. FRYER. 1993. Viral vaccines for aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3: 225-240.
- LOZANO, M. 2001. Acuicultura y Pesca, Compendio y directorio, pp19-134. Ed. Aqunoticias, Santiago, Chile.
- MAUEL, M. J., S. J. GIOVANNONI, J. L. FRYER. 1996. Development of polymerasa chain reaction assays for detection, identification and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.* 26: 189-195.
- MC ALLISTER, P. E., X. REYES. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* 7: 319-322.
- MENDEZ, R. 1998. La acuicultura en Chile. *Aquanoticias Int.* 45: 12-21.
- MIDTLING, P.J., L. J. REITAN, L. SPEILBREG. 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellf. Immunol.* 6: 335-350.
- MIDTLING, P. J., A. LILLEHOUG. 1998. Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis. Aquat. Org.* 32: 91-97.
- MURPHY, F. A., C. M. FAQUET, D. H. BISHOP, S. A. GHABRIAL, A. W. JARVIS, G. P. MARTELLI, M. A. MAYO, M. D. SUMMERS. 1995. Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Wien.
- ORGANIZATION INTERNATIONAL OF EPIZOOTIAS (O.I.E.). 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. Third edition. Paris, Francia.
- OLIVEIRA, J. 1999. Determinación de las condiciones óptimas para la detección de Birnavirus acuáticos mediante RT-PCR. Tesis de licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- POPPE, T.T., O. BRECK. 1997. Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Dis. Aquat. Org.* 29: 219-226.

- POST, G. 1983. Textbook of the Fish Health. Ed. TFH Publications, Inc. Ltd. U.S.A.
- QUAGLIO, F. 1989. Infectious disease from Birnavirus with particular reference to infectious pancreatic necrosis of salmonids. *Riv. Ital. Acquacol.* 24: 167-179.
- RABINOVICH, N. R., P. MCLNNES, D. L. KLEIN, B. F. HALL. 1994. Vaccine technologies: View to the future. *Science* 265: 1401-1404.
- ROBERTS, F. 1989. Fish Pathology. Ed. Baillière Tindall, London, Inglaterra.
- SALINAS, G, J. CONTRERAS, P. SMITH, J. LARENAS. 1997. Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. In: *VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish. Abstracts Book.* Heriot-Watt University, Edimburgh, *Eur. Ass. Fish Pathol.* pp. P-057.
- SANO, T. 1995. Viruses and viral diseases of salmonids. *Aquaculture* 132: 43-52.
- 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.
- 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., P. OJEDA, P. PIZARRO, J. R. CONTRERAS, J. J. LARENAS. 1998. Entry portal of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Third International Symposium of Aquatic Animal Health. Baltimore, Maryland, USA.
- SPEILBERG, L. A. 2003. Causes and consequences of side effects with the use of intraperitoneal oil vaccines in salmonids. Pp.8. Conferencia en Feria Internacional AQUA SUR 2003. Puerto Montt-Chile.
- STOSKOPF, M. 1993. Fish medicine. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia.
- TIZARD, I. 2002. Inmunología Veterinaria. Sexta ed. Ed. Mc Graw-Hill. Mexico.
- WOLF, K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Ed. Ithaca, New York.

8. ANEXOS

ANEXO N° 1

Tabla de Speilberg (N°3) : Clasificación esquemática de lesiones intraabdominales post vacunación intraperitoneal en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Mittlyng y col., 1996).

| Escala | Apariencia visual de la cavidad abdominal | Severidad de la lesión |
|---------------|---|---|
| 0 | Sin lesiones | No |
| 1 | Adherencias muy débiles frecuentemente localizadas en el sitio de la inyección. Poco probable que el operador lo perciba. | Nada o poca opacidad del peritoneo post evisceración. |
| 2 | Pocas adherencias, 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 del peritoneo, permanece después desconexión manual de adherencias. |
| 3 | Moderadas adherencias, 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 adherencias con granuloma, interconectado extensivamente órganos internos, los cuales aparecen como una sola unidad. Probable, 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 Opacado, y 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 el anterior punto, frecuentemente con considerable cantidad de melatonina. Vísceras no se pueden sacar sin causar daño en integridad del filete. | Deja mayor daño de la canal. |

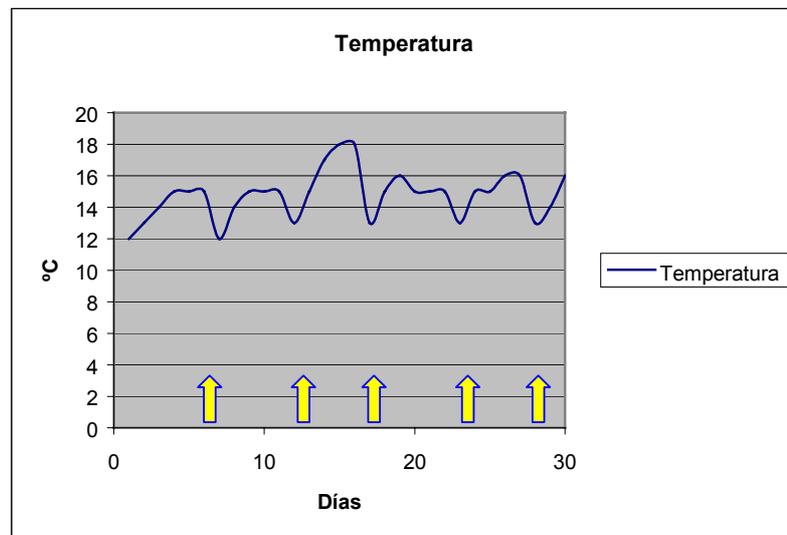
ANEXO N° 2

Peso de los peces al momento de realizar la necropsia del estudio de seguridad de dos vacunas bivalentes IPN/SRS en Salmones del Atlántico (*Salmo salar*)

| N° Peces | Acuario 1 | Acuario 2 | Acuario 3 | Acuario 4 | Acuario 5 | Acuario 6 | Acuario 7 | Acuario 8 | Acuario 9 | Acuario 10 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 1 | 40,59 g | | 30,15 g | 30,04 g | 30,11 g | 27,10 g | 36,11 g | 25,38 g | 40,10 g | 37,10 g |
| 2 | 30,49 g | | 27,10 g | 33,57 g | 33,70 g | 29,20 g | 30,10 g | 37,55 g | 43,20 g | 41,50 g |
| 3 | 40,20 g | | 32,59 g | 24,89 g | 37,10 g | 25,90 g | 31,50 g | 27,35 g | 40,70 g | 40,30 g |
| 4 | 32,46 g | | 24,10 g | 38,20 g | 40,70 g | 30,11 g | 27,10 g | 24,78 g | 39,11 g | 44,00 g |
| 5 | 36,11 g | | 27,90 g | 24,70 g | 41,30 g | 29,90 g | 28,80 g | 33,97 g | 38,76 g | 37,80 g |
| 6 | 26,60 g | | 39,20 g | 28,34 g | 30,89 g | 25,00 g | 29,30 g | 28,58 g | 39,10 g | 39,90 g |
| 7 | 32,29 g | | 37,59 g | 30,24 g | 29,15 g | 29,70 g | 24,55 g | 24,51 g | 40,70 g | 40,45 g |
| 8 | 31,49 g | | 31,89 g | 30,71 g | 27,22 g | 33,40 g | 26,30 g | 24,93 g | 37,56 g | 36,30 g |
| 9 | 26,80 g | | 40,09 g | 22,66 g | 30,11 g | 31,00 g | 30,00 g | 28,28 g | 39,45 g | 37,10 g |
| 10 | 28,04 g | | 29,10 g | 28,24 g | 31,12 g | 32,90 g | 31,70 g | 24,61 g | 49,50 g | 38,20 g |
| 11 | 28,40 g | | 27,67 g | 27,10 g | 29,17 g | 32,10 g | 27,70 g | 24,93 g | 37,50 g | 39,70 g |
| 12 | 28,59 g | | 39,50 g | 22,33 g | 44,50 g | 37,90 g | 26,00 g | 28,58 g | 39,40 g | 43,00 g |
| 13 | 25,38 g | | 42,30 g | 27,10 g | 26,90 g | 23,10 g | 25,90 g | 30,27 g | 37,70 g | 43,00 g |
| 14 | 38,73 g | | 28,90 g | 22,33 g | 37,89 g | 24,70 g | 24,90 g | 27,71 g | 39,45 g | 44,00 g |
| 15 | 30,98 g | | 23,50 g | 27,32 g | 39,77 g | 27,30 g | 26,00 g | 30,49 g | 41,55 g | 50,00 g |
| 16 | 34,00 g | | 22,50 g | 29,02 g | 35,00 g | 29,33 g | 31,00 g | 34,73 g | 42,10 g | 40,05 g |
| 17 | 46,10 g | | 33,23 g | 28,37 g | 24,10 g | 31,70 g | 33,00 g | 34,66 g | 43,20 g | 39,90 g |
| 18 | 28,71 g | | 29,50 g | 35,51 g | 28,70 g | 33,70 g | 30,10 g | 33,41 g | 46,50 g | 37,70 g |
| 19 | 28,46 g | | 37,50 g | 22,96 g | 31,20 g | 30,00 g | 33,90 g | 28,31 g | 36,50 g | 36,90 g |
| 20 | 28,57 g | | 26,70 g | 23,67 g | 28,37 g | 35,16 g | 27,50 g | 28,74 g | 39,89 g | 38,49 g |
| 21 | 32,75 g | | 25,20 g | 24,73 g | 30,00 g | 27,10 g | 27,00 g | 24,48 g | 38,70 g | 38,20 g |
| 22 | 42,74 g | | 22,10 g | 24,04 g | 27,80 g | 26,70 g | 29,30 g | 30,08 g | 39,70 g | 41,20 g |
| 23 | 28,90 g | | 37,92 g | 25,67 g | 29,90 g | 28,50 g | 26,73 g | 30,04 g | 37,90 g | 41,20 g |
| 24 | 33,72 g | | 38,32 g | 24,74 g | 33,00 g | 39,70 g | 31,40 g | 24,18 g | 42,70 g | 40,00 g |
| 25 | 26,82 g | | 23,70 g | 24,02 g | 39,00 g | 37,00 g | 33,00 g | 31,77 g | 45,00 g | 39,00 g |
| 26 | 32,76 g | | 24,32 g | 41,24 g | 28,00 g | 35,00 g | 34,00 g | 37,23 g | 46,31 g | 39,25 g |
| 27 | 22,88 g | | 31,79 g | 28,37 g | 26,76 g | 29,70 g | 37,76 g | 26,64 g | 47,10 g | 37,29 g |
| 28 | 32,19 g | | 32,40 g | 20,49 g | 29,40 g | 30,55 g | 35,94 g | 27,79 g | 49,30 g | 46,76 g |
| 29 | 25,68 g | | 33,69 g | 31,54 g | 33,90 g | 33,00 g | 31,79 g | 28,10 g | 42,00 g | 45,00 g |
| 30 | 33,10 g | | 40,39 g | 24,65 g | 29,27 g | 26,90 g | 29,30 g | 24,19 g | 39,16 g | 47,70 g |
| 31 | 41,82 g | | 29,30 g | 31,26 g | 27,10 g | 37,90 g | 30,00 g | 29,41 g | 34,90 g | 46,90 g |
| 32 | 36,14 g | | 31,40 g | 26,02 g | 26,50 g | 30,00 g | 27,79 g | 27,17 g | 37,26 g | 42,10 g |
| 33 | 30,14 g | | 33,41 g | 26,09 g | 24,70 g | 31,00 g | 26,35 g | 24,24 g | 39,90 g | 40,90 g |
| 34 | 34,60 g | | 27,43 g | 27,74 g | 29,90 g | 27,30 g | 27,78 g | 23,30 g | 40,00 g | 39,00 g |
| 35 | 39,23 g | | 26,70 g | 31,11 g | 32,40 g | 32,00 g | 30,58 g | 24,73 g | 42,15 g | 47,80 g |
| 36 | | | | | | | | | 41,10 g | 48,97 g |
| 37 | | | | | | | | | 40,35 g | 36,78 g |
| 38 | | | | | | | | | 37,78 g | 37,90 g |
| 39 | | | | | | | | | 39,12 g | 36,90 g |
| 40 | | | | | | | | | 36,10 g | 35,00 g |

ANEXO N° 3

Temperaturas diarias del agua durante los 30 días que duró el experimento de seguridad de dos vacunas bivalentes IPN/SRS en Salmones del Atlántico (*Salmo salar*).



↑ Cambio de agua.

ANEXO N° 4

Tabla N° 4: Comparación de la vacuna experimental bivalente IPN/SRS (“A”) en sus dos dosis y controles en relación al grado de adherencias intraabdominales, posterior a la aplicación intraperitoneal en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g.

| Clasificación según Speilberg | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|------|------|------|---|---|---|----------------|
| Vacuna “A” | Grado de Adherencia | | | | | | | Total de peces |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Dosis 0,2 ml | 9 | 15 | 7 | 4 | | | | 35 |
| % lesión | 25,7 | 42,9 | 20 | 11,4 | | | | |
| Control 0,2 ml | 40 | | | | | | | 40 |
| % lesión | 100 | | | | | | | |
| Dosis 0,4 ml | 4 | 21 | 34 | 11 | | | | 70 |
| % lesión | 5,7 | 30 | 48,6 | 15,7 | | | | |
| Control 0,4 ml | 40 | | | | | | | 40 |
| % lesión | 100 | | | | | | | |

Tabla N° 5: Comparación de la vacuna experimental bivalente IPN/SRS (“B”) en sus dos dosis y controles en relación al grado de adherencias intraabdominales, posterior a la aplicación intraperitoneal en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g.

| Clasificación según Speilberg | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|------|------|---|---|---|---|----------------|
| Vacuna “B” | Grado de Adherencia | | | | | | | Total de peces |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Dosis 0,2 ml | 27 | 31 | 12 | | | | | 70 |
| % lesión | 38,6 | 44,3 | 17,1 | | | | | |
| Control 0,2 ml | 40 | | | | | | | 40 |
| % lesión | 100 | | | | | | | |
| Dosis 0,4 ml | 4 | 39 | 27 | | | | | 70 |
| % lesión | 5,7 | 55,7 | 38,6 | | | | | |
| Control 0,4 ml | 40 | | | | | | | 40 |
| % lesión | 100 | | | | | | | |

Tabla N°6: Comparación de una misma dosis (0,2 ml) de dos vacunas experimentales bivalentes IPN/SRS (A y B) en relación al grado de adherencias intraabdominales, posterior a la aplicación intraperitoneal en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g.

| Clasificación según Speilberg | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|------|------|------|---|---|---|----------------|
| | Grado de Adherencia | | | | | | | Total de peces |
| Vacuna "A" | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Dosis 0,2 ml | 9 | 15 | 7 | 4 | | | | 35 |
| % lesión | 25,7 | 42,9 | 20 | 11,4 | | | | |
| Vacuna "B" | | | | | | | | 70 |
| Dosis 0,2 | 27 | 31 | 12 | | | | | |
| % lesión | 38,6 | 44,3 | 17,1 | | | | | |
| Control 0,2 | 40 | | | | | | | 40 |
| % lesión | 100 | | | | | | | |

Tabla N°7: Comparación de una misma dosis (0,4 ml) de dos vacunas experimentales bivalentes IPN/SRS (A y B) en relación al grado de adherencias intraabdominales, posterior a la aplicación intraperitoneal en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g.

| Clasificación según Speilberg | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|------|------|------|---|---|---|----------------|
| | Grado de Adherencia | | | | | | | Total de peces |
| Vacuna "A" | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Dosis 0,4 | 4 | 21 | 34 | 11 | | | | 70 |
| % lesión | 5,7 | 30 | 48,6 | 15,7 | | | | |
| Vacuna "B" | | | | | | | | 70 |
| Dosis 0,4 | 4 | 39 | 27 | | | | | |
| % lesión | 5,7 | 55,7 | 38,6 | | | | | |
| Control 0,4 | 40 | | | | | | | 40 |
| % lesión | 100 | | | | | | | |

9. AGRADECIMIENTOS.

- Gracias a mis padres Juan y Angélica quienes me brindaron todo su cariño y apoyo durante mi época estudiantil.
 - A Juan Carlos y Marion por su apoyo “incondicional”.
 - A mis abuelos por su cariño y preocupación a la distancia.
 - Al Instituto de Ictiopatología por su apoyo brindado en ésta Memoria de Título.
 - A mi profesor patrocinante Dr. Ricardo Enríquez por su apoyo en esta Memoria.
 - A todos mis amigos que me acompañaron en todos estos años de estudio
- ... a todos ellos muchas gracias.