

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

**PATOGENICIDAD DE DOS AISLADOS CHILENOS Y LA CEPA VR-299 DEL
VIRUS DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN) EN SALMÓN DEL
ATLÁNTICO (*S. salar*) Y TRUCHA ARCOIRIS (*O. mykiss.*).**

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

ALVARO RIVERA RAMÍREZ

VALDIVIA – CHILE

2003

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enríquez S.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Frédérick Ahumada M.

Dr. Carlos Farías R.

FECHA DE APROBACIÓN

.....

ÍNDICE

	PÁGINAS
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODO	7
5. RESULTADOS	11
6. DISCUSIÓN	25
7. BIBLIOGRAFÍA	30
8. ANEXOS	33

1. RESUMEN

Patogenicidad de dos aislados chilenos y la cepa VR-299 del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en Salmón del Atlántico (*S. salar*) y Trucha Arcoiris (*O. mykiss*).

El virus de la Necrosis Pancreática infecciosa (IPNV) fue aislado en Chile en 1983, sin embargo el primer brote reportado ocurrió en 1994. En la actualidad el virus se encuentra en todos los sitios donde se cultivan salmónidos causando diferentes grados de pérdidas a la industria tanto en agua dulce como en agua de mar. Con el objetivo de obtener información acerca de la patogenicidad de diferentes aislados se llevó a cabo este experimento.

Alevines de salmón del Atlántico (n: 200) y Trucha Arcoiris (n: 200) fueron mantenidos en agua dulce e inoculados i.p. con 0,1 ml de tres diferentes concentraciones (10^3 , 10^4 , 10^5 TCID₅₀/ml) de los aislados chilenos V103/98 y V1190/99 (obtenidos de un brote de IPN en *S. salar* y de un ejemplar de *O. mykiss* en estado de portador) y la cepa VR-299 de IPNV. La mortalidad así como los signos externos e internos de la enfermedad fueron registrados por 51 días tomándose muestras de riñón y bazo para confirmar la presencia viral usando cultivos celulares (CHSE-214) e IFAT-IPNV.

La mortalidad acumulada obtenida en *S. salar* fue de 65% a 90% con la cepa VR-299, 5% a 15% con el aislado V103/98 y 0% a 35% con el aislado V1190/99. En *O. mykiss*, por otra parte, la mortalidad acumulada fue de 65% a 90% con la cepa VR-299, 0% a 40% con el aislado V103/98 y 0% a 10% con el aislado V1190/99. Todos los sobrevivientes después de 51 días post-inoculación fueron positivos a la presencia del virus.

La cepa VR-299 fue el virus más patogénico para ambas especies, causando alta mortalidad en *S. salar*. El aislado chileno V1190/99 es más patogénico en *S. salar* y es avirulento a la concentración más baja en ambas especies. El aislado chileno V103/98 es avirulento a las dos mas bajas en *O. mykiss* y produce mortalidad baja en *S. salar*. Todos los ejemplares inoculados con IPNV sobrevivientes al experimento desarrollaron el estado de portador. Los signos clínicos fueron consistentes con la presentación de la enfermedad, debiéndose principalmente a la acción de la cepa VR-299.

Palabras clave: IPN, patogenicidad, Salmón del Atlántico, Trucha Arcoiris.

2. SUMMARY

Pathogenicity of two chilean IPN isolates and VR-299 strain of the virus in Atlantic Salmon (*S. salar*) and Rainbow Trout (*O. mykiss*).

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) was isolated in Chile in 1983, however the first outbreak was in 1994. Today the virus can be found everywhere salmonid fish are cultured causing different degrees of losses to the industry both in fresh and seawater. In order to obtain information about the pathogenicity of different isolates this experiment was performed.

Atlantic salmon (n: 200) and Rainbow trout (n: 200) fry were maintained in fresh water and inoculated i.p. with 0,1 ml of three different concentrations (10^3 , 10^4 , 10^5 TCID₅₀/ml) of the V103/98 and 1190/99 chilean isolates (collected from outbreak of IPN in *S. salar* and *O. mykiss* fish in carrier state of the disease) and the VR-299 strain of IPNV. Mortality was recorded for 51 days, external and internal clinical signs were registered and samples of kidney and spleen were taken to confirm the viral presence using cell culture (CHSE-214) and IFAT-IPNV.

Cumulative mortality in *S. salar* ranged from 65% to 90% with VR-299 strain, 5% to 15% with the isolate V103/98 and 0% to 35% with the isolate V1190/99. In *O. mykiss*, in the other hand, the cumulative mortality were 65% to 90% with VR-299 strain, 0% to 40% with the isolate V103/98 and 0% to 10% with the isolate V1190/99. All survivors after 51 days post inoculation were positive to the presence of the virus.

The strain VR-299 was the most pathogenic IPN virus for both species, causing high mortalities in *S. salar*. The chilean isolate V1190/99 is more pathogenic in *S. salar* and is non virulent at the lowest concentration for both species. The chilean isolate V103/98 is non virulent in the two lowest concentrations in *O. mykiss* and produce low mortality in *S. salar*. All survivors to the experiment inoculated with IPNV developed carrier state of the disease. The clinical signs were consistent with the presentation of the disease mostly due to the action of the VR-299 strain.

Key words: IPN, pathogenicity, Atlantic salmon, Rainbow trout.

3. INTRODUCCIÓN

Junto con las frutas, el vino y la madera, el salmón es uno de los principales productos no tradicionales que Chile envía al exterior, con una expansión tan sostenida que lo ha llevado a representar el 22% del mercado mundial, después de Noruega que tiene poco más del 40%. En Trucha Arcoiris (*O. mykiss*), nuestro país continúa siendo el primer productor mundial y uno de los principales de Salmón Coho (*O. kisutch*) (Mendez, 2001)

Durante el año 2002 la producción nacional de Salmón y Trucha registró un volumen total de 331.405,9 toneladas netas, dejando retornos por producto exportado de US\$ 988,2 millones (Aquanoticias, 2003).

El proceso productivo de carácter intensivo junto con el constante aumento de expansión del volumen de producción, concentrándose principalmente en la décima región, así como la internación de ovas desde el extranjero, coloca a nuestro país en una condición sanitaria vulnerable (Cerna, 2000). Desde esta perspectiva las enfermedades virales son de una importancia no menor, ya que la mayoría son agudas o subagudas, son de difícil diagnóstico y no existe tratamiento para ellas (Sano, 1995).

El impacto económico de las virosis se hace sentir principalmente en condiciones de explotación intensiva. Las pérdidas afectan generalmente a animales jóvenes, y su costo directo es más sensible cuando se producen mortalidades en peces adultos, puesto que la inversión que supone el cuidado y el alimento aumenta con el tiempo (de Kinkelin y col., 1991).

El virus IPN (Necrosis Pancreática Infecciosa) fue detectado por primera vez en Chile en 1983, no provocando problemas serios sino hasta principios de la década de los '90, cuando se presentaron brotes en la zona central. Los primeros casos comprobados en la X región se evidenciaron en 1998, diseminándose en forma acelerada durante 1999 comenzando afectar a peces de casi todos los lagos de la X región durante el año 2000. La engorda se vio seriamente afectada, ya que existieron pérdidas en los primeros meses de ingreso al mar, llegando hasta un 50 a 60% de mortalidad en los casos más severos en el año 2000 (Bustos y col, 1999).

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es un virus perteneciente a la familia Birnaviridae (Taksdal, 1999). Esta familia contiene tres géneros: Género Aquabirnavirus cuya especie tipo es IPNV, Género Avibirnavirus cuya especie tipo es el virus de la bursitis infecciosa (IBDV) y el género Entomobirnavirus cuya especie tipo es el virus Drosophila X (DXV) (Dobos, 1995).

Morfológicamente el virus se caracteriza por ser no envuelto, icosaédrico y de un diámetro de 60 nm. La cápside consiste en 180 subunidades estructurales conformando 92 capsómeros (Quaglio, 1989; Dobos, 1995). El genoma del virión consiste en dos segmentos de

ARN de doble cadena (segmento A y B, 2.5×10^6 y 2.3×10^6 daltons, respectivamente) (Dobos, 1995).

Las proteínas estructurales del virus IPN se distribuyen dentro de tres clases: un gran polipéptido viral VP1 (94 kDa, 4% de la masa de la proteína viral), un polipéptido de tamaño mediano VP2 (54 kDa, 62%), y dos polipéptidos pequeños VP3 (31 kDa, 28%) y VP3a (29 kDa, 6%) (Dobos, 1995).

Okamoto y col (1983) clasificó el virus de acuerdo a sus propiedades de seroneutralización en tres grupos. El primer grupo incluye a las cepas americanas de IPN, el segundo grupo agrupa a las cepas europeas del virus, mientras que el tercero incluye la cepa avirulenta Ab.

Hill y Way (1995) realizaron un estudio de neutralización cruzada con casi 200 aislados de IPNV y otros Aquabirnavirus. Este estudio generó el serogrupo A, conteniendo los serotipos A₁ al A₉ y serogrupo B, conteniendo un único serotipo B₁.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa y agentes IPNV-like son uno de los virus acuáticos más ampliamente distribuidos (Plumb, 1999).

El virus es altamente resistente. Es gradualmente inactivado en agua natural o agua destilada y igualmente estable en estuarios o agua marina, reflejando un potencial para permanecer infeccioso en todo el medio ambiente acuático. Es sensible al calentamiento pero se preserva bien por congelamiento a -80°C . Puede ser almacenado por muchos años en glicerol al 10% a 4°C , pero para un almacenamiento de largo plazo se recomienda la preservación en 10% de suero fetal o 50% de glicerol a -80°C (Roberts, 1989).

Su infectividad es inactivada por muchos productos químicos comúnmente usados en el cultivo de peces y centros de investigación. Utilizando un adecuado tiempo de exposición y concentración, el cloro, formalina, iodo, ozono y el pH 12.5 son todos viricidas (Wolf, 1988). Sin embargo, la actividad viricida de productos como el etanol, cresol, iodóforos o cloro es reducida en presencia de materia orgánica (Stoskopf, 1993).

En salmonídeos la infección aguda ocurre entre el primer y cuarto mes de vida y puede resultar en una mortalidad acumulada cercana al 100% (Stoskopf, 1993). Los peces más grandes y robustos son los primeros en desarrollar los signos asociados al IPN (Plumb, 1999).

La enfermedad es afectada por la temperatura del agua. Es así como la frecuencia de la enfermedad decrece a temperaturas menores de 5.5°C y superiores a 16°C (Quaglio, 1989).

Otro factor importante es la edad del pez, ya que se ha observado una resistencia edad dependiente a brotes de la enfermedad que comienza a desarrollarse alrededor de los tres a cinco meses de vida (Taksdal, 1999).

Signos externos de la enfermedad son: pigmentación oscura, distensión abdominal, exoftalmia, hemorragias en la base de las aletas, branquias pálidas, pseudofecas, taquipnea, natación errática girando en el eje longitudinal en la superficie o permanencia inmóvil en el fondo del estanque (Quaglio, 1989; Roberts, 1989; Wolf, 1988 ; Stoskopf, 1993; Plumb, 1999).

Al examen interno los peces presentan petequias en vísceras, especialmente en los ciegos pilóricos y tejido adiposo. El bazo, corazón, hígado y riñones están pálidos, la cavidad corporal está llena con un fluido ascítico amarillo claro, el tracto digestivo está sin alimento pero el estómago posterior está lleno de un fluido mucoide de aspecto claro o lechoso (Quaglio, 1989; Roberts, 1989; Wolf, 1988; Stoskopf, 1993; Plumb, 1999).

La observación histopatológica revela un daño extenso del tejido pancreático que varía en severidad de áreas necróticas diseminadas rodeadas de tejido intacto a una completa destrucción del tejido acinar. La destrucción celular y la resultante liberación de lipasa, causa la necrosis en el tejido adiposo peripancreático. Los cambios histopatológicos también ocurren en el tejido renal excretor y hematopoyético con congestión o hemorragia, edema, destrucción y descamación del epitelio glomerular mientras que la mucosa intestinal presenta inflamación y necrosis que genera un aumento de la secreción y desprendimiento celular manifestándose macroscópicamente como exudado catarral (McKnight y Roberts, 1976; Wolf, 1988; Quaglio, 1989; Roberts, 1989; Stoskopf, 1993; Plumb, 1999).

Entre los salmonídeos, la principal fuente de IPNV son peces del mismo stock y, secundariamente, víctimas de una enfermedad activa y sobrevivientes en estado de portador. El estado de portador puede exceder el 90% de los sobrevivientes de un brote (Wolf, 1988). El virus es diseminado por los peces clínicamente enfermos y portadores en su orina, fecas y productos sexuales. La transmisión ocurre lateralmente por contacto e ingestión y verticalmente durante el desove. El virus ingresa por contacto con las branquias, ingestión con el alimento o pasaje a través de los poros sensoriales de la línea lateral (Wolf, 1988; Stoskopf, 1993).

El diagnóstico presuntivo puede basarse en los signos de la enfermedad, histopatología de los tejidos e historia de la patología de la población de peces, sin embargo, para confirmar el diagnóstico, se requiere del aislamiento del virus en cultivo celular y su identificación se basa en reactividad serológica a través de neutralización, anticuerpos fluorescentes, reacción de inmunoperoxidasa, fijación de complemento, inmunoelectroforesis, coaglutinación o ELISA (Cerna, 2000). Este procedimiento de confirmación diagnóstica es el que más éxito ha tenido en Noruega, Escocia y Chile, pero existen otras opciones que se están desarrollando basadas en la biología molecular (PCR) y Dot-Blot (Bustos y col., 1999).

El virus de la necrosis pancreática infecciosa es replicado rutinariamente en diferentes líneas celulares (BF-2, CHSE-214, EPC, RTG-2) produciendo un efecto citopático (CPE) lítico en las monocapas de cultivos celulares que se caracteriza por presentar picnosis nuclear y un proceso de encogimiento celular de pequeñas placas visibles a las 24 horas post infección, para llegar a la total destrucción en 2 a 3 días post infección para el serotipo Sp (Roberts,

1989).

La temperatura de incubación para el aislamiento de este virus no es crítica y puede realizarse en un rango de temperatura de 4 a 26°C, siendo comúnmente usada la temperatura de 15°C donde aparece el efecto citopático alrededor de 48 horas post inoculación. Bajo condiciones favorables de cultivo, el CPE raramente aparece después de cinco días. En su ausencia, si embargo, un siguiente pasaje debiera ser realizado (Wolf, 1988).

En relación a lo anterior, conocer la enfermedad y el efecto que tiene en los salmonídeos de cultivo en Chile es de vital importancia, especialmente referido a la posible diferencia en la patogenicidad de las cepas aisladas en nuestro país, ya sea de brotes de la enfermedad o de peces reproductores en estado de portadores, para lo cual se ha desarrollado este trabajo.

De esta forma se planteó como hipótesis de trabajo que los aislados nacionales del virus I.P.N. son diferentes en su patogenicidad para la Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) y el Salmón Atlántico (*S. salar*).

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material Biológico

4.1.1.1. Células: Se utilizó para realizar los experimentos la línea celular CHSE-214 (Lannan y col., 1984). Para su mantención y multiplicación se utilizó MEM (Minimum Essential Medium) con la adición de suero fetal bovino en un 10% a 20°C, usando penicilina a 100 UI/ml y estreptomicina en 100 µg/ml con el fin de limitar la contaminación bacteriana.

Al momento de la inoculación viral en monocapa celular se modificaron la temperatura y concentración de suero fetal bovino que fueron 15°C y 2%, respectivamente.

4.1.1.2. Virus: Los virus utilizados fueron la cepa VR-299 y dos aislados nacionales del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) mantenidos en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

El primer aislado nacional fue obtenido de un caso clínico de Salmón del Atlántico (*S.salar*) en 1998, asignándosele el número de laboratorio V103-98.

El segundo aislado nacional se obtuvo de un reproductor de Trucha Arcoiris (*O.mykiss*) en estado de portador en 1999, asignándosele el número de laboratorio V1190-99.

4.1.1.3. Peces: Se utilizaron 210 alevines de Salmón del Atlántico (*S.salar*) y 210 alevines de Trucha Arcoiris (*O.mykiss*) de 10 a 15 gramos.

4.1.2. Materiales de experimentación: Estos experimentos utilizaron las dependencias de la Sala de Inoculación Experimental del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

Para la mantención de los peces se utilizó 10 acuarios con 100 lts de agua dulce aproximadamente, en régimen de aireación constante y con un sistema de recirculación compuesto por un filtro (FLUVAL 203, Mod.2200303 420 lts/min.) con cámara doble de carbón activado y perlón.

Un tercio del agua fue cambiada una vez a la semana con el fin de retirar el detritus orgánico acumulado en el fondo de los acuarios.

Tanto con el material utilizado (quechas, baldes, etc.), como en el pediluvio de la sala de inoculación y el agua retirada de los acuarios se utilizó cloro en concentración de 4 gr/lit como desinfectante para evitar la diseminación del agente así como para evitar la infección de los peces con cualquier organismo contaminante.

4.1.3. Materiales de Laboratorio: Para efectos de toma y procesamiento de muestras se utilizaron las dependencias y materiales del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.2. MÉTODO

El experimento se dividió en dos fases. La primera fase se realizó en la primavera del año 2000 utilizándose en la experiencia ejemplares de *S. salar*. La segunda fase se realizó en la primavera del 2001 utilizándose ejemplares de *O. mykiss*.

4.2.1. Titulación viral: Con el fin de obtener el título viral que fue utilizado como base para lograr las concentraciones virales a inocular, se siguió el método de titulación viral del punto final 50% (Reed y Muench, 1938). Para ello se colocaron 0,1 ml del virus en 0,9 ml de MEM al 2% de suero fetal bovino realizándose diluciones seriadas hasta llegar a la dilución 10^{-9} . A continuación se sembró en triplicado 0,1ml de cada una de las diluciones en una microplaca de titulación que contenía una monocapa de células CHSE-214 incubadas previamente por 24 horas, observándose diariamente la presencia de efecto citopático (CPE), durante un máximo de 7 días y se procedió a realizar el cálculo del título viral en TCID₅₀/ml obteniéndose los siguientes títulos:

Fase uno (S. Atlántico):

Cepa VR-299 : $10^{9,66}$ TCID₅₀/ml.

Aislado V103-98: $10^{6,16}$ TCID₅₀/ml.

Aislado V1190-99: $10^{6,5}$ TCID₅₀/ml.

Fase dos (T. Arcoiris):

Cepa VR-299: $10^{6,33}$ TCID₅₀/ml.

Aislado V103-98: $10^{7,49}$ TCID₅₀/ml.

Aislado V1190-99: $10^{5,66}$ TCID₅₀/ml.

Los títulos obtenidos fueron diluidos hasta alcanzar las concentraciones de inoculación (10^4 , 10^5 y 10^6 TCID₅₀/ml) según procedimiento descrito por Villegas y Purchase (1980).

4.2.2. Inoculación: Los peces provenientes de una piscicultura comercial sin antecedentes de la presentación de I.P.N, fueron transportados hasta el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile, depositándose en un estanque

circular de aproximadamente 500 lts con aireación constante en espera de ser transferidos a los acuarios de experimentación.

Se tomó una muestra aleatoria de 10 peces, a los cuales se les realizó un chequeo sanitario consistente en necropsia, toma de muestras para bacteriología y virología, improntas de hígado, bazo y riñón y observación microscópica al fresco de branquias para descartar la presencia de lesiones u organismos que interfirieran con el experimento.

A continuación se llevaron los peces a los acuarios, permaneciendo en ellos una semana previo a la inoculación, para permitir su aclimatación y así disminuir el estrés de inoculación.

La inoculación se realizó vía intraperitoneal con un volumen de 0,1 ml por pez, previa anestesia de los peces con Benzocaína (BZ-20 ®) llevándose a cabo, independiente de la fase de la experimentación, de la siguiente forma:

Tabla N°1: Grupos de inoculación de *S.salar* y *O. mykiss* de 10 a 15 gr con la cepa VR-299 y dos aislados nacionales de IPNV.

GRUPO	Acuario	Concentración de inoculación (0,1 ml)	Nº de peces
Cepa VR-299	1A	10^3 TCID ₅₀ /pez	20
	1B	10^4 TCID ₅₀ /pez	20
	1C	10^5 TCID ₅₀ /pez	20
Aislado V103/98	2A	10^3 TCID ₅₀ /pez	20
	2B	10^4 TCID ₅₀ /pez	20
	2C	10^5 TCID ₅₀ /pez	20
Aislado V1190/99	3A	10^3 TCID ₅₀ pez	20
	3B	10^4 TCID ₅₀ /pez	20
	3C	10^5 TCID ₅₀ /pez	20
Control	4	Medio sin virus	20

Posterior a la inoculación, se observaron los peces durante las primeras horas post inoculación, continuándose una observación continua por 51 días.

Los peces se dejaron sin alimento hasta el día siguiente post inoculación, para luego alimentarlos con una dieta comercial al 2% de su peso corporal/día.

4.2.3. Registro de la temperatura: Se controló la temperatura dos veces al día para posteriormente promediarse y generar la temperatura correspondiente al día de experimentación.

4.2.4. Confirmación de la mortalidad por IPNV.

4.2.4.1. Signos clínicos: Para este proceso durante la experiencia se retiraron los individuos moribundos o muertos, realizándose una necropsia de acuerdo a un protocolo desarrollado en el Instituto de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.2.4.2. Reaislamiento: Luego de registrar los hallazgos de la necropsia se procedió a tomar muestras de bazo y riñón de 5 peces para así formar un pool de órganos de 1 gramo aproximadamente. La muestra fue puesta en un tubo con 9ml de MEM al 2% de suero fetal bovino y 4x de antibióticos para limitar la infección bacteriana, lográndose así una dilución de 1:10.

La muestra fue macerada en un mortero previamente enfriado con ayuda de arena estéril para facilitar el proceso. A continuación la muestra se centrifugó en una centrifuga refrigerada a 4000 r.p.m por 10 min a 10°C.

El sobrenadante obtenido fue diluido en MEM con 2% de suero fetal bovino y 1x de Ab, para obtener diluciones de 1:50 y 1:100.

Las diluciones fueron sembradas en duplicado en una placa de 24 pocillos que contenía una monocapa de células CHSE-214, incubada previamente por 24 horas.

La adsorción se realizó a 15°C por 1 hora, agregándose luego 1ml de MEM con 2% de suero fetal bovino y 1x de Ab por pocillo incubándose a 15°C. Se observaron las placas diariamente para ver la aparición de CPE por un máximo de 7 días para confirmar la presencia viral. Se consideró negativa toda muestra que no desarrolló CPE después del segundo pasaje.

4.2.4.3. Confirmación por IFAT: Con posterioridad a la aparición de CPE se consideró toda muestra positiva, procediéndose a la utilización de un kit comercial (BioX®¹) de IFAT-IPNV para confirmar la presencia del virus en el cultivo celular.

El procedimiento anterior se utilizó de igual modo con los individuos sobrevivientes, los cuales se sacrificaron al finalizar el período de experimentación.

¹ Bio X, Bio-fluo IPN
30 Hoogveldlaan
1700 Dilbeek, Bélgica.

5. RESULTADOS

5.1. MORTALIDAD

5.1.1 Mortalidad en Salmón del Atlántico (*S. salar*): El gráfico que a continuación se presenta muestra la mortalidad en tres grupos de Salmón del Atlántico inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 de IPNV a una temperatura promedio de 15,6°C.

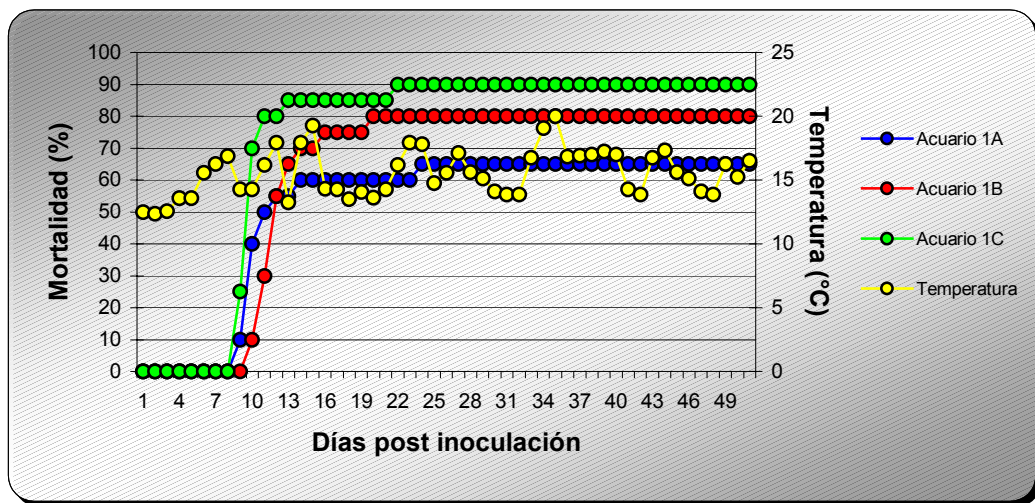


Gráfico N°1: Mortalidad acumulada en tres grupos de Salmón del Atlántico (*S. salar*) mantenidos en agua dulce inoculados i.p con la cepa VR-299 del virus IPN a 15,6°C.

Los grupos 1B y 1C (10^4 y 10^5 TCID₅₀/pez) registraron una mortalidad de 90 y 80% respectivamente, equivalentes a 16 y 18 peces durante el período de observación, mientras que la mortalidad alcanzada en el grupo 1A (10^3 TCID₅₀/pez) fue de 65%, equivalente a 13 individuos muertos. La principal alza en la mortalidad se concentró principalmente entre los 128 y 189 grados día post inoculación para los tres grupos.

El gráfico número dos representa la mortalidad obtenida en los tres grupos de *S. Atlántico* inoculados i.p con el aislado nacional V103/98 a una temperatura promedio de 15,6 °C.

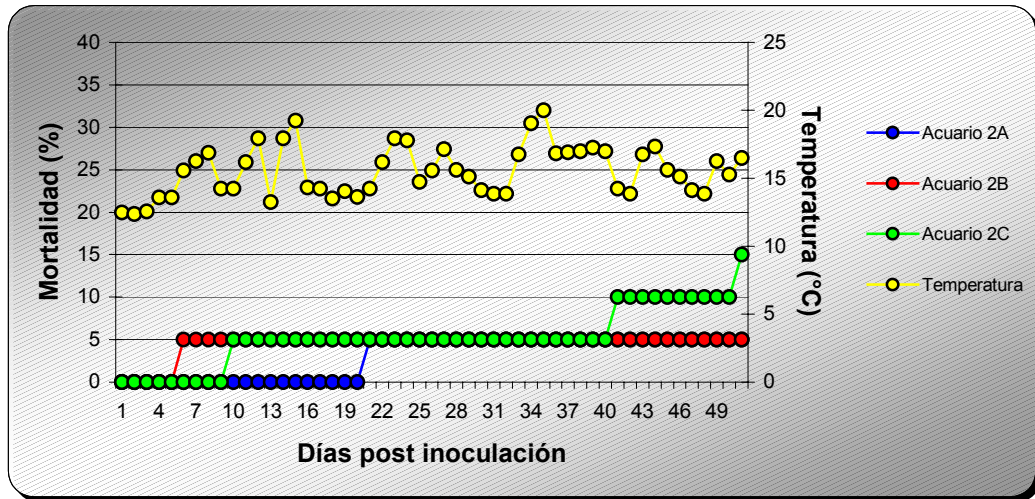


Gráfico N°2: Mortalidad acumulada en tres grupos de Salmón del Atlántico (*S. salar*) mantenidos en agua dulce inoculados i.p con un aislado Chileno (V103/98) del virus IPN a 15,6°C.

El gráfico muestra para los grupos 2A y 2B una mortalidad final de 5% (1pez), ocurrida en los 310 y 80 grados día post inoculación, respectivamente. El grupo 2C presentó una mortalidad final de un 15% (3 peces) que fue registrada a los 142, 637 y 794 grados día post inoculación.

El siguiente gráfico se muestra la mortalidad de los tres grupos de *S. Atlántico* inoculados i.p con el aislado nacional V1190/99 a una temperatura promedio de 15,6 °C.

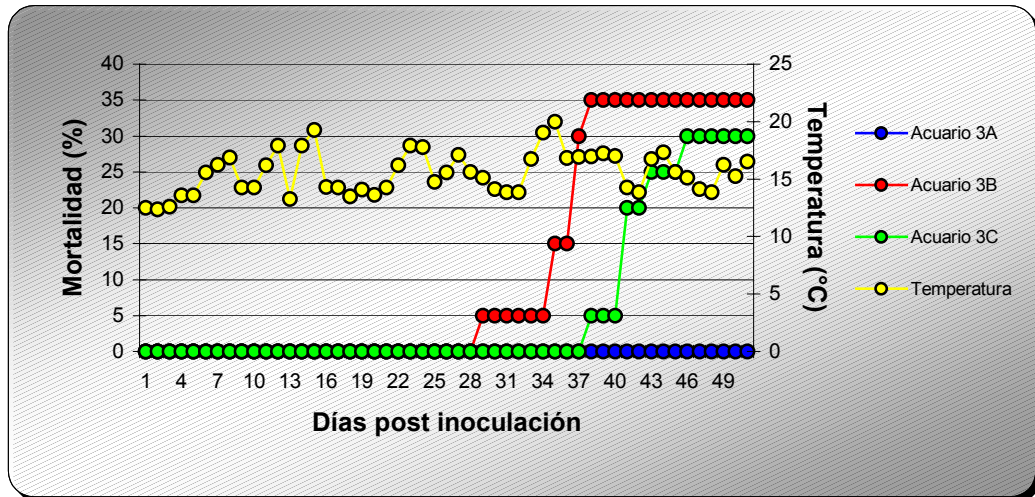


Gráfico N°3: Mortalidad acumulada en tres grupos de Salmón del Atlántico (*S.salar*) mantenidos en agua dulce inoculados i.p con un aislado Chileno (V1190/99) del virus IPN a 15,6 °C.

No se observó mortalidad en el grupo 3A (10^3 TCID₅₀/pez), mientras que en el grupo 3B (10^4 TCID₅₀/pez) esta alcanzó un 35% (7 peces) ocurriendo a los 440, 538, 571, y 588 grados día. En el grupo 3C (10^5 TCID₅₀/pez) se registró una mortalidad de 30% (6 peces) desarrollándose en los 588, 637, 668 y 716 grados día post inoculación.

El grupo control (4) no presentó mortalidad durante el ensayo.

5.1.2. Mortalidad en Trucha Arcoiris (*O. mykiss*): La mortalidad ocurrida en Trucha arcoiris inoculados i.p con el virus VR-299 a 15,9 °C promedio se muestra en el siguiente gráfico

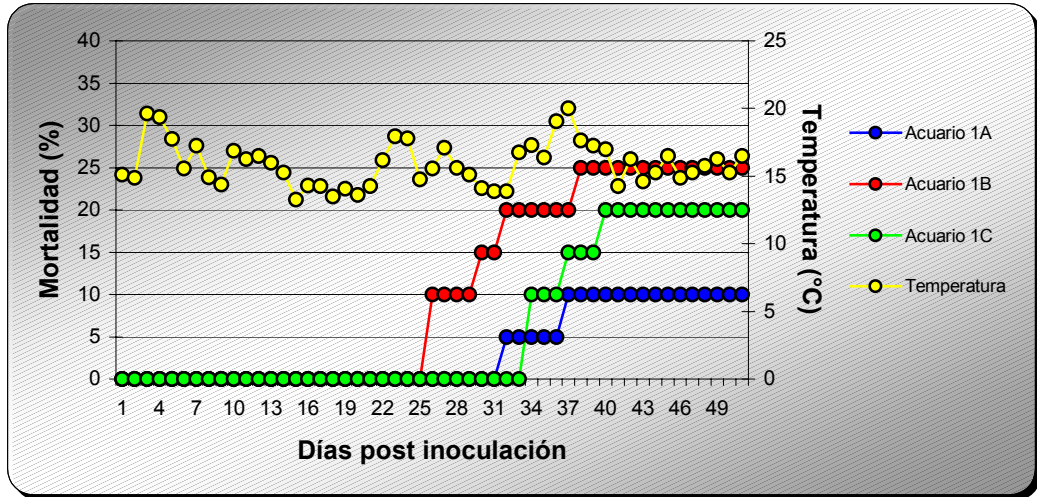


Gráfico N°4: Mortalidad acumulada en tres grupos de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce inoculados i.p con la cepa VR-299 del virus IPN a 15,9°C.

Los valores alcanzados por los grupos 1B y 1C (concentración viral 10^4 y 10^5 TCID₅₀/pez) fueron de 20 y 25% de mortalidad acumulada final, que equivale a una mortalidad por grupo respectivamente de 4 y 5 peces, concentrándose en el grupo 1B entre los 409 y 499 grados día y el grupo 1C entre los 533 y 588 grados día. El grupo 1A registró una mortalidad de un 10% (2 peces), acumulándose la mortalidad entre los 499 y 588 grados día post inoculación.

El gráfico número cinco presenta la mortalidad registrada en T. Arcoiris inoculados i.p con el aislado nacional V103/98 a una temperatura promedio de 15,9 °C.

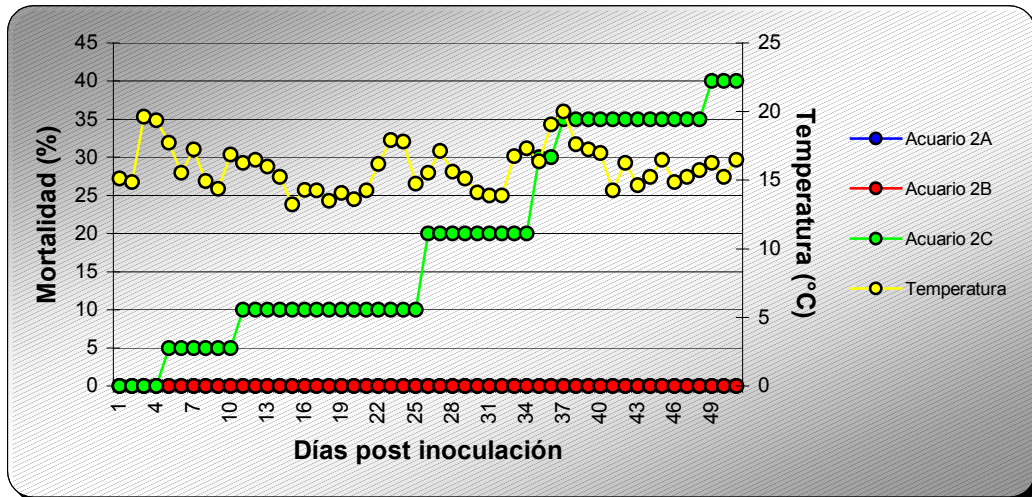


Gráfico N°5: Mortalidad acumulada en tres grupos de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce inoculados i.p con un aislado Chileno (V103/98) del virus IPN a 15,9°C.

El gráfico señala que no ocurrió mortalidad en los peces que se inocularon con el aislado V103/98 a concentraciones de 10^3 y 10^4 TCID₅₀/pez (acuarios 2A y 2B respectivamente), mientras que en el grupo inoculado con una concentración de 10^5 TCID₅₀/pez (acuario 2C) la mortalidad acumulada alcanzó a un total de 8 peces (40%) concentrándose en los 87 a 182 grados día y 550 a 588 grados día, muriendo el último pez a los 779 grados día post inoculación.

En el gráfico número 6 se representa la mortalidad obtenida en tres grupos de T. Arcoiris inoculadas i.p con el aislado nacional V1190/99 a una temperatura promedio de 15,9°C.

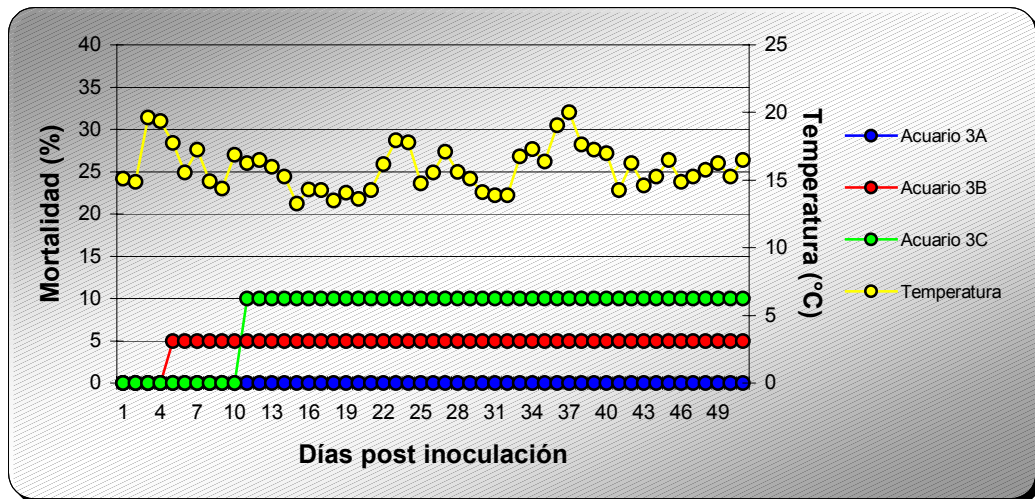


Gráfico N°6: Mortalidad acumulada en tres grupos de Trucha Arcoiris (*O. mykiss*) de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce inoculados i.p con un aislado Chileno (V1190/99) del virus IPN a 15,9°C.

El grupo inoculado con la concentración 10^3 TCID₅₀/pez (3A) no presentó mortalidad durante el período de observación, mientras que los grupos inoculados con 10^4 y 10^5 TCID₅₀/pez (3B y 3C) obtuvieron una mortalidad acumulada de 5% y 10%, correspondiendo a 1 y 2 peces, presentándose la mortalidad en los 87 y 182 grados día, respectivamente.

El grupo control (4) no presentó mortalidad durante todo el período de observación.

5.2. COMPROBACIÓN DE MORTALIDAD POR IPNV

5.2.1. Signos Clínicos

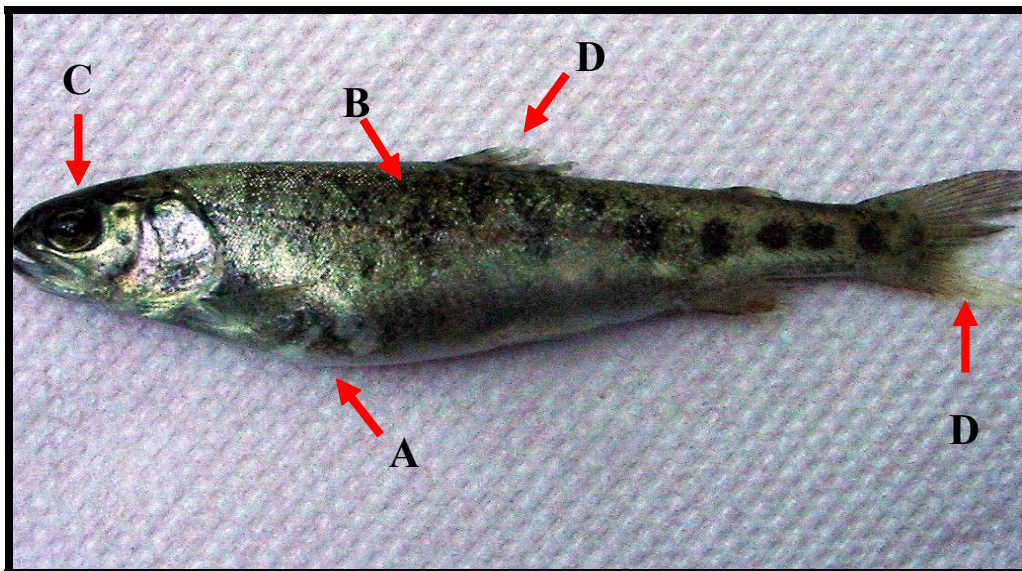
5.2.1.1. Signología externa: Previo a la muerte de los peces se observaron alteraciones atribuibles a la acción del virus como:

- Anorexia
- Permanencia en el fondo del acuario
- Taquipnea
- Baja condición corporal

La signología externa más marcada observada al momento de la necropsia durante la experiencia para ambos grupos experimentales fue la siguiente:

- Distensión abdominal
- Melanosis
- Daño en las aletas
- Branquias anémicas
- Exoftalmia
- Hemorragia en la base de las aletas

Algunos de estos signos pueden observarse en la fotografía N°1:



Fotografía N°1: Ejemplar de *O. mykiss* infectado intraperitonealmente con IPNV cepa VR-299. Se observa distensión abdominal (A), melanosis y descamación (B), leve exoftalmia (C) y daño en las aletas (D).

En el gráfico N°7 se muestra un resumen de la frecuencia de presentación de los signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos experimentales de *S. salar* mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 y dos aislados Chilenos (V103/98 y V1190/99) del virus IPN

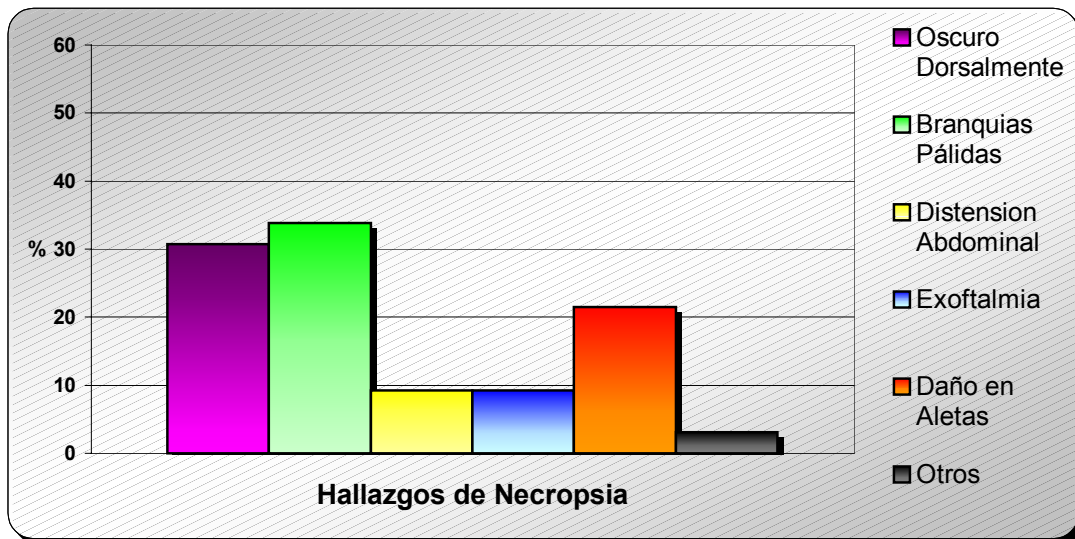


Gráfico N°7: Porcentaje de presentación de los principales signos externos a la necropsia en individuos muertos/moribundos de *S.salar* mantenidos en agua dulce a 15,6°C e inoculados i.p con IPNV.

En el gráfico N°8 se presenta un resumen de los signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos experimentales de *O. mykiss* mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 y dos aislados Chilenos (V103/98 y V1190/99) del virus IPN

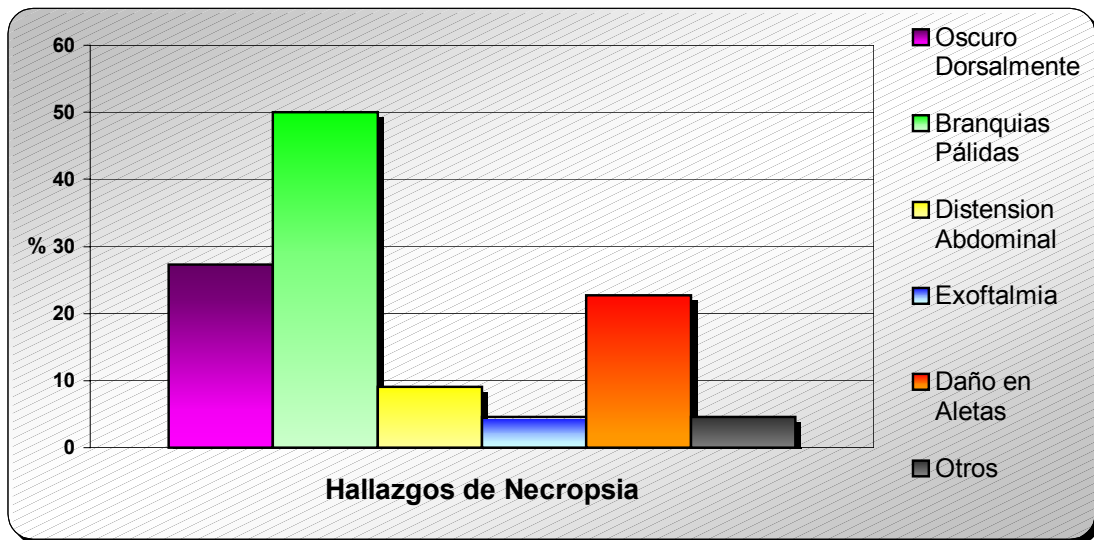


Gráfico N°8: Porcentaje de presentación de los principales signos externos a la necropsia en individuos muertos/moribundos de *O. mykiss* mantenidos en agua dulce a 15,9°C e inoculados i.p con IPNV.

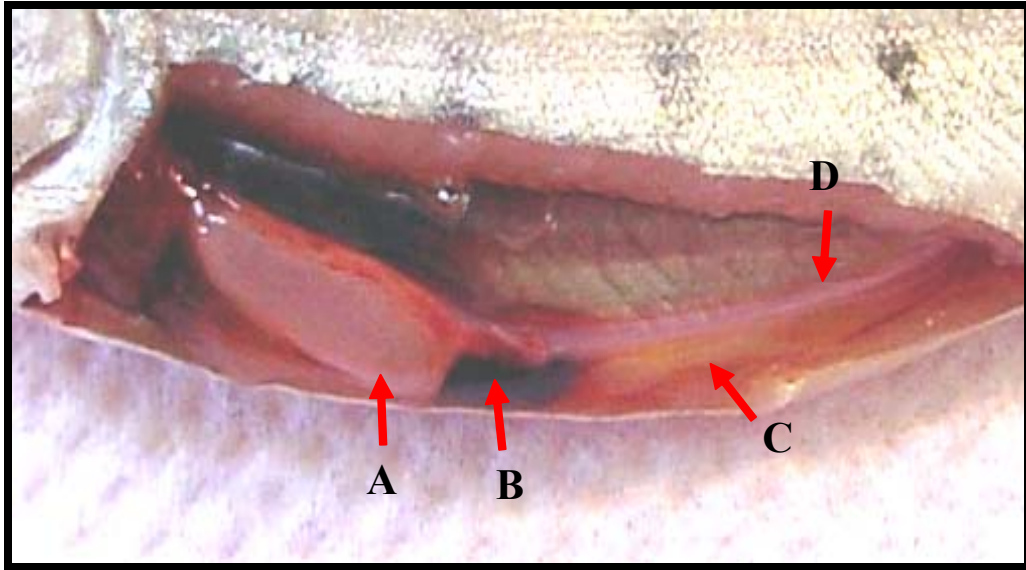
Los gráficos muestran una mayor frecuencia de presentación de los signos branquias pálidas, oscurecimiento del dorso y daño en las aletas para las dos especies inoculadas.

Es necesario mencionar que los signos externos fueron mucho más evidentes para la cepa VR-299, ya que en los peces inoculados con los aislados nacionales del virus IPNV la signología clínica fue leve, tanto previo a la muerte de los peces como al hallazgo de necropsia, observándose en la mayoría de los casos, únicamente una baja en el consumo de alimento, de la condición corporal y oscurecimiento dorsal.

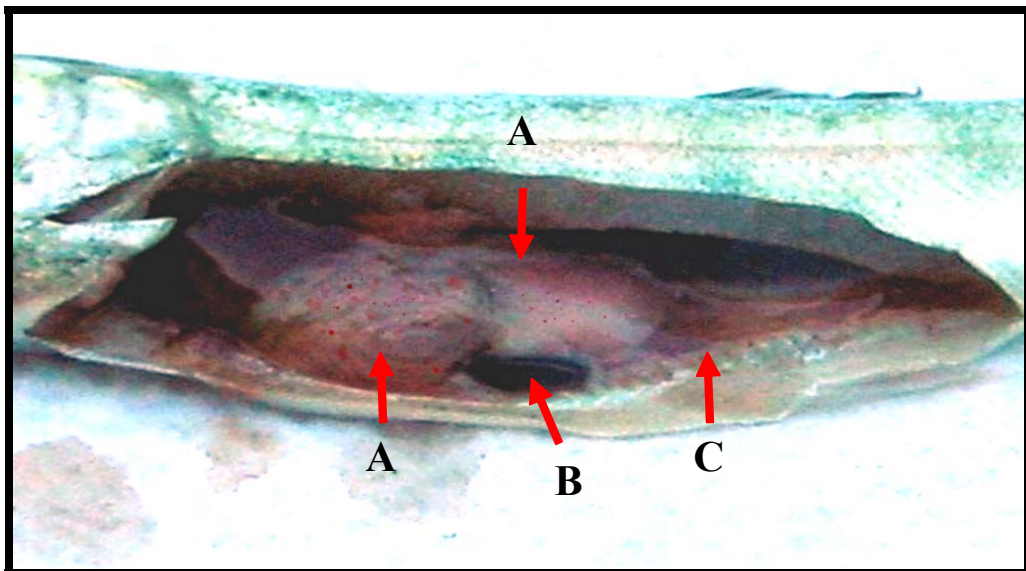
5.2.1.2.. Signología Interna: La signología interna más importante observada en los individuos correspondió a la siguiente:

- Hemorragias petequiales en ciegos pilóricos
- Enteritis
- Esplenomegalia
- Ascitis
- Contenido gastrointestinal mucoso

Las lesiones pueden ser observadas en las fotografías N°2 y N°3.



Fotografía N°2: Espécimen de *S. salar* infectado intraperitonealmente con IPNV cepa VR-299. Se observa el estómago distendido con contenido mucoso (A), esplenomegalia (B), fluido ascítico serohemorrágico (C) y enteritis catarral (D).



Fotografía N°3: Espécimen de *O. mykiss* infectado intraperitonealmente con IPNV aislado V1190/99. Se observa hemorragias petequiales en ciegos pilóricos y grasa abdominal (A), esplenomegalia (B) y enteritis catarral (C).

El porcentaje de presentación de la signología clínica interna de los individuos moribundos/muertos durante la experiencia se detalla en el gráfico N°9 y N°10.

En el gráfico N°9 se muestra un resumen de la frecuencia de presentación de los signos clínicos internos encontrados a la necropsia en los tres grupos experimentales de *S. salar* mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 y dos aislados Chilenos (V103/98 y V1190/99) del virus IPN.

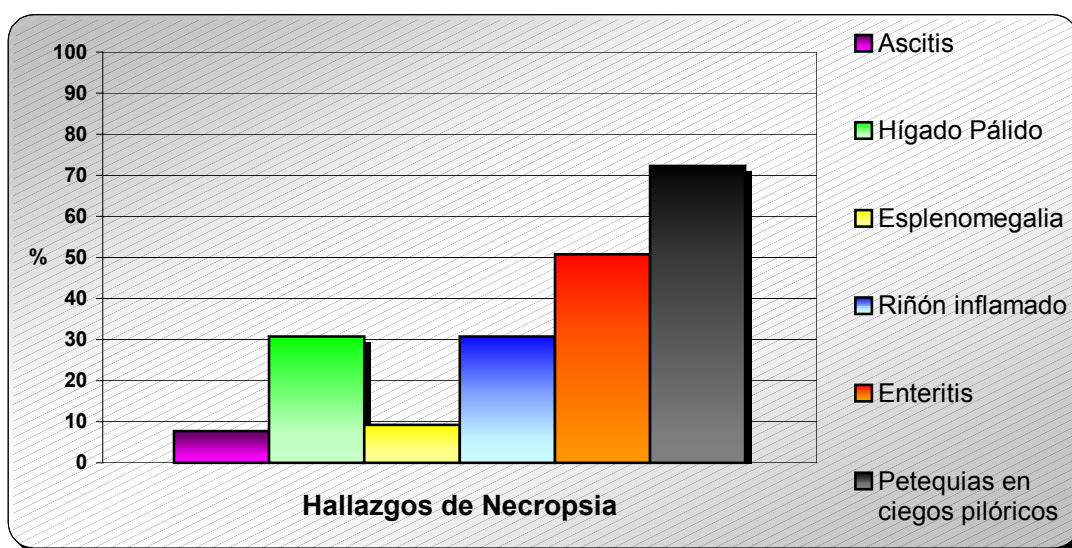


Gráfico N°9: Porcentaje de presentación de los principales signos internos a la necropsia en individuos muertos/moribundos de *S. salar* mantenidos en agua dulce a 15,6°C e inoculados i.p con IPNV.

En el gráfico N°10 se muestra un resumen de la frecuencia de presentación de los signos clínicos internos encontrados a la necropsia en los tres grupos experimentales de *O. mykiss* mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 y dos aislados Chilenos (V103/98 y V1190/99) del virus IPN.

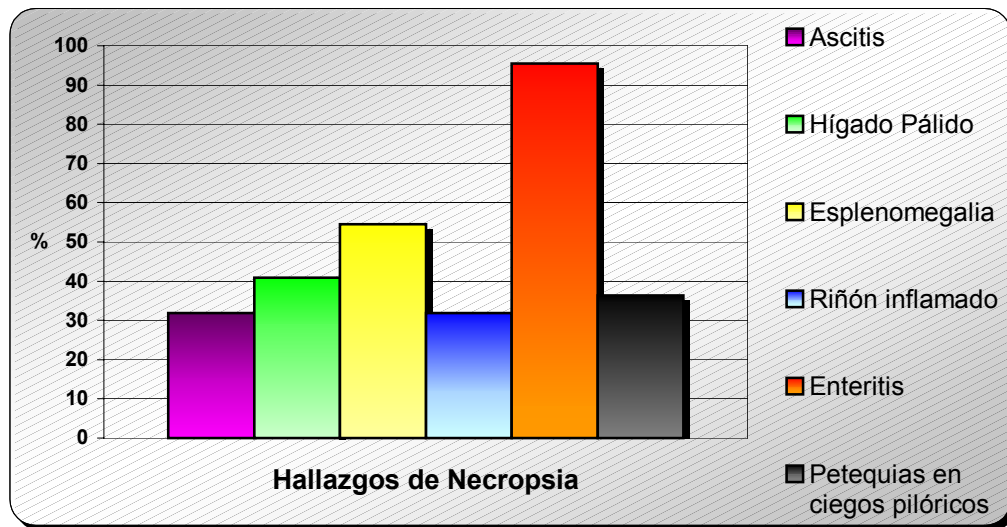


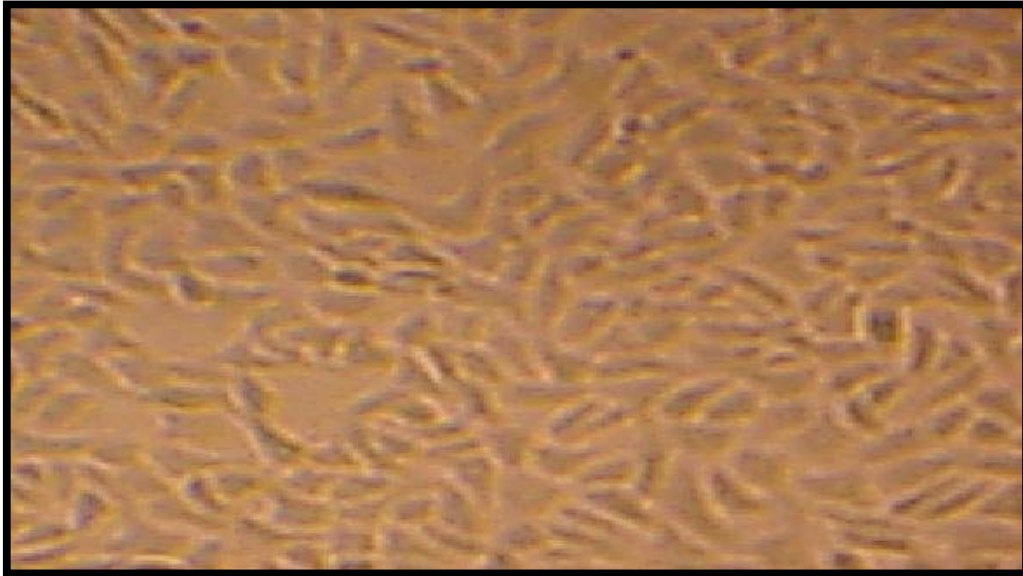
Gráfico N°10: Porcentaje de presentación de los principales signos internos a la necropsia en individuos muertos/moribundos de *O. mykiss* mantenidos en agua dulce a 15,9°C e inoculados i.p con IPNV.

El gráfico N°9 muestra que en *S. salar* el signo clínico interno más frecuente son las hemorragias petequiales en ciegos pilóricos (72,3%), seguido de la enteritis (50,7%) y el hígado pálido (30,7%).

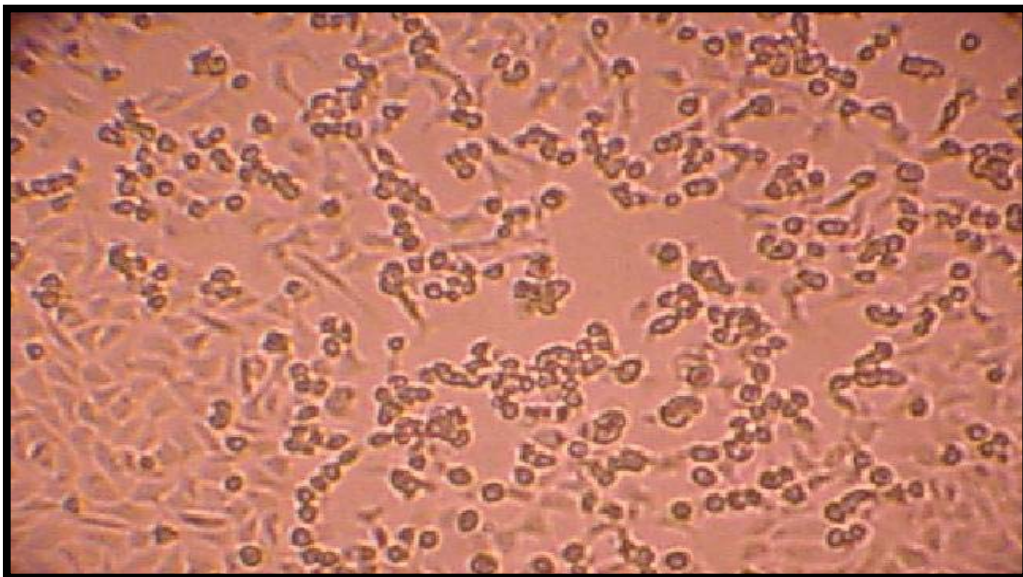
En *O. mykiss* (gráfico N°10) la signología clínica interna más frecuente es la enteritis (95,4%), seguida por la esplenomegalia (54,5%) y el hígado pálido (40,9%).

Al igual que en las lesiones externas observadas tanto en *S. salar* como en *O. mykiss*, las lesiones internas se presentaron con más intensidad en los peces inoculados con la cepa VR-299 que con los aislados nacionales del virus IPNV.

5.2.2. Reaislamiento del virus: Fue posible reaislar el virus de las muestras de ejemplares muertos/moribundos a través de cultivo celular, con expresión de CPE (ver fotografías N°4 y N°5) entre el primer y tercer día del primer pasaje en todas las muestras. Lo mismo ocurrió con los peces sobrevivientes 51 días p.i. del experimento.

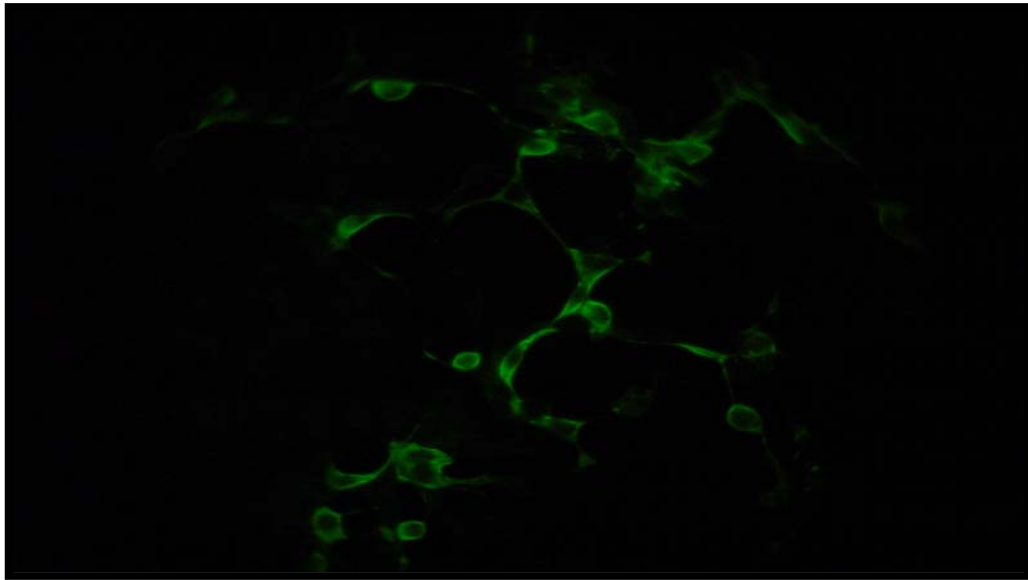


Fotografía N°4: Monocapa de células CHSE-214 no infectada (100X).



Fotografía N°5: Monocapa celular de la línea CHSE-214 con CPE producida por IPNV (100X).

5.2.3. Confirmación por IFAT: La totalidad de las muestras que presentaron CPE en cultivo celular presentaron también fluorescencia específica al test de IFAT-IPNV como se observa en la fotografía N°6



Fotografía N°6: Células de la línea celular CHSE-214 que muestran una fluorescencia citoplasmática específica correspondiente a IPNV (400X).

6. DISCUSIÓN

La detección en Chile del virus I.P.N en la década de los ochenta y su presentación asociada a mortalidad en incremento gradual en la década de los noventa, ha sido motivo de preocupación tanto para productores como para científicos.

La presente tesis evalúa el efecto de la inoculación experimental de tres diferentes concentraciones de dos aislados nacionales (V103/98 recuperado de un brote de *S. salar* y V1190/99 recuperado de un reproductor de *O. mykiss*) y de la cepa de referencia VR-299 del virus IPN, en las especies de interés comercial Trucha Arcoiris y Salmón del Atlántico.

El análisis general comparando la mortalidad total producida en ambas especies por IPNV muestra una mortalidad más baja para *O. mykiss*, equivalente a un 12,2% (22/180), mientras que en *S. salar* se registró una mortalidad de 36,1% (65/180), lo que indicaría una diferencia en la susceptibilidad al IPNV de estas especies.

Datos nacionales indican que si bien IPNV afecta a las principales especies de salmonídeos de cultivo, el Salmón del Atlántico es el que ha presentado mayor mortalidad asociada a la enfermedad (San Martín, 2001).

El efecto del aislado V103/98 es de una mortalidad total similar en ambas especies inoculadas, obteniéndose un 13,3% en *O. mykiss* (8/60) y 8,3% (5/60) en *S. salar*. Se observa que las concentraciones 10^3 y 10^4 TCID₅₀/ml del aislado, no produjeron mortalidad en el grupo de *O. mykiss*, y en *S. salar* la mortalidad fue mínima (1/20), lo que indica que el aislado es avirulento para *O. mykiss* y de baja virulencia para *S. salar*, bajo estas condiciones experimentales. En la concentración 10^5 TCID₅₀/ml se produce una diferencia destacable, obteniéndose una mortalidad de un 40% en *O. mykiss* (8/20) mientras que en *S. salar* alcanza solo un 15% (3/20).

Es necesario mencionar que dado el número de peces en cada acuario (20 peces) diferencias leves de mortalidad repercuten fuertemente en los porcentajes de mortalidad obtenidos en cada unidad experimental.

La mortalidad total alcanzada con el aislado V1190/99 es de 5% en los alevines de *O. mykiss* (3/60), mientras que en *S. salar* es mucho mayor (21,6%). Al comparar la mortalidad producida en las diferentes concentraciones del aislado, la concentración más baja (10^3 TCID₅₀/ml) no produjo mortalidad en ninguna de las dos especies inoculadas, siendo por lo tanto avirulenta bajo esas condiciones experimentales. En las dos concentraciones mayores (10^4 y 10^5 TCID₅₀/ml) en *O. mykiss* producen mortalidades bajas (1/20 y 2/20) y algo superiores en *S. salar* (4/20 y 6/20) sin distinguirse cambios apreciables para ambas concentraciones dentro de los grupos inoculados.

Las diferencias de mortalidad entre los aislados nacionales de IPNV pueden explicarse, en parte, por el origen de los mismos. El aislado V103/98 proviene de un brote en *S. salar*, mientras que el aislado V1190/99 se obtuvo de un reproductor de *O. mykiss*, lo que explicaría la diferencia de virulencia, al estar el primer aislado más activo.

La cepa VR-299 en *O. mykiss* produjo una mortalidad total de 18,3% (11/60), mientras que en *S. salar* la mortalidad fue mayor, registrando un 78,3% (47/60). La mortalidad en las diferentes concentraciones inoculadas (10^3 , 10^4 , 10^5 TCID₅₀/ml) inoculadas en *O. mykiss* no fueron muy diferentes (2/20, 5/20 y 4/20, respectivamente) no superando el 25% de mortalidad. En *S. salar* la mortalidad alcanzada en las tres concentraciones inoculadas fue alta, superando el 50% en todas las concentraciones (13/20, 16/20 y 18/20, respectivamente).

La mortalidad para las diferentes especies inoculadas es similar a lo descrito en la literatura. En general, se describe que IPN en salmonídeos se manifiesta desde un cuadro subclínico hasta mortalidades cercanas al 100% (Wolf, 1988; Quaglio, 1989; Stoskopf, 1993; Plumb, 1999). En estudios similares se observan diferencias de mortalidad por IPNV dependiendo de la virulencia del virus y la especie utilizada en el experimento.

Silim y col. (1982) en Canadá lograron mortalidades medias a bajas (9%) al inocular vía baño un aislado local de IPNV en *O. mykiss*, mientras que Ahne y col. (1989) obtuvieron mortalidades de 50% con la cepa Sp, 25% a 29% con la cepa Ab y 0% con la cepa He en la misma especie.

Tasksdal y col (1997) inoculó vía baño 2 grupos de *S. salar* con un aislado noruego de IPNV identificado como Sp, obteniendo mortalidades de 76% y 82%. Al repetir la experiencia en *Salvelinus fontinalis* obtuvo mortalidades de 42% y 43%.

En otros estudios realizados en Chile, Calderón (1998) logró en *O. kisutch* una mortalidad de 34% con la cepa VR-299 y 0% con la cepa Ab, mientras que en *S. salar* las mortalidades obtenidas fueron 40% y 8%, respectivamente.

San Martín (2001) al desafiar alevines de *S. salar* con la cepa Sp de IPNV, obtuvo mortalidades de 32,9%. En un estudio similar, Mansilla (2002) logró mortalidades de 26,7% y 50% en 2 grupo de alevines de *S. salar*.

Las curvas de mortalidad obtenidas durante este ensayo muestran períodos de incubación dispares. En *S. salar* se observa períodos de incubación de aproximadamente 10 días (141 grados día) para el aislado V103/98 y la cepa VR-299. Lo mismo se observa para los dos aislados nacionales inoculados en *O. mykiss* (166 grados día). En los restantes casos la mortalidad se desarrolla después del día 20 (296 grados día). La mortalidad acumulada se eleva en general por 15 días para luego estabilizarse, a excepción de la concentración 10^5 TCID₅₀/ml del aislado V103/98 en *O. mykiss* y *S. salar*, que generan mortalidad constante durante todo el período de observación. A este respecto, Wolf (1988) caracteriza el período de incubación de la enfermedad como corto. En *S. fontinalis* a 12°C

usando 10 aislados de IPNV logró la primera mortalidad y signología clínica al cuarto día y la mortalidad máxima entre los días 12 al 18 p.i para luego estabilizarse.

San Martín (2001) obtuvo la primera mortalidad el día 10 p.i, aumentando la mortalidad acumulada por los siguientes 15 días para luego estabilizarse. Mansilla (2002) por otra parte, pesquisó mortalidad a partir del día 29, concentrándose la mortalidad mayormente durante los siguientes 13 días. Calderón (1998) en *S. salar* observó la primera mortalidad el día 6 después de inocular con la cepa VR-299 de IPNV, concentrándose la mortalidad entre los días 10 y 25 p.i. Al inocular la cepa Ab la mortalidad comenzó el día 20 p.i, concentrándose entre el día 20 y 23 p.i. En *O. kisutch*, al inocular la cepa VR-299 de IPNV, la mortalidad comenzó el día 4 p.i y se extendió hasta el día 20 p.i.

La diferencia de mortalidad en las distintas concentraciones inoculadas del virus sigue una relación dosis-efecto, siendo en general mayor la mortalidad a dosis inoculadas mayores. Esta relación se pierde al inocular el aislado chileno V1190/99 en *S. salar* y la cepa VR-299 en *O. mykiss*, donde la concentración 10^4 TCID₅₀/ml logra mayor mortalidad que la concentración 10^5 TCID₅₀/ml, siendo una diferencia mínima en ambos casos (1pez). Esta diferencia puede ser explicada por diversos factores. En primer lugar el método utilizado para la titulación viral. La TCID₅₀ detecta la dilución a la cual la actividad biológica (en este caso el CPE) de una suspensión viral es detectable (Villegas y Purchase, 1980), no así el número de partículas virales. De este modo al momento de la inoculación, errores de volumen mínimo pueden reflejarse en la mortalidad, sobre todo en diluciones con títulos similares.

Otro factor a tomar en cuenta es que durante el desarrollo de la enfermedad los individuos afectados están constantemente eliminando el virus al medio (Wolf, 1988; Quaglio, 1989; Stoskopf, 1993; Plumb, 1999). Durante una presentación clínica de IPN la concentración del virus en el medio puede ser elevada. Wolf (1988) describe en un brote de IPN una concentración viral de 25000 partículas virales de IPNV por litro de agua en un estanque con una tasa de recambio de agua 88 lt/min, mientras que Plumb (1999) obtuvo un título de 10^5 TCID₅₀/ml de IPNV en el agua. Este fenómeno altera la concentración del virus recibida por los peces en estudio, ya que no sólo responderían a la concentración inoculada i.p, sino también a una cantidad variable de virus eliminado por los individuos enfermos dentro del sistema de recirculación de agua. A esto debe agregarse la gran resistencia que posee el virus IPN en el agua (Wolf, 1988; Quaglio, 1989; Stoskopf, 1993; Plumb, 1999).

Bowden y col (2002) en experimentos de cohabitación con smolts de *S. salar* determinaron que la mortalidad entre peces en cohabitación parece depender del número de peces inoculados que produzcan una necesaria presión de infección, si esta se logra, los peces en cohabitación no inoculados pueden superar en mortalidad a los inoculados i.p con el virus.

Bebak-Williams y col (2002) al experimentar con alevines de *O. mykiss* describen como factores de remoción de IPNV del sistema, la tasa de recambio del agua de los

estanques y la extracción de ejemplares muertos, pudiendo ambos afectar las tasas de mortalidad del experimento. Si bien la tasa de recambio del agua de los estanques fue baja y respondía mas bien a la necesidad de remover la materia orgánica acumulada en el fondo de los acuarios, esta existió, así como la remoción de los individuos moribundos/muertos, eliminándose virus del medio que eventualmente podrían generar una presión de infección para producir mayor mortalidad y que también podrían explicar las curvas de mortalidad de algunos virus inoculados que presentan mortalidades en días posteriores. Esto es importante teniendo en cuenta que todos los sobrevivientes a la inoculación fueron positivos al virus, pudiendo corresponder a individuos que desarrollaron el estado de portador o eventualmente, ejemplares en fase de incubación del virus.

La signología clínica externa más frecuente encontrada en ambas especies, corresponde a la palidez de branquias seguido por el oscurecimiento del dorso. La signología interna más frecuente en *S. salar* son las hemorragias petequiales en los ciegos pilóricos y la enteritis, en cambio en *O. mykiss* el signo más frecuente es la enteritis, seguido de la esplenomegalia. La signología, si bien no es exclusiva de IPN, concuerda con lo descrito en la literatura para la enfermedad (Quaglio, 1989; Roberts, 1989; Wolf, 1988; Stoskopf, 1993)

Calderón (1998), San Martín (2001) y Mansilla (2002) también encontraron signología similar.

El hecho de que la signología tanto externa como interna se produjera con más intensidad en los ejemplares inoculados con la cepa VR-299, concuerda con la mayor virulencia de esta cepa descrita en la literatura (Wolf, 1988; Stoskopf, 1993; Calderón, 1998).

Los aislados nacionales presentaron menor capacidad para producir signología, hecho que se relaciona con la menor mortalidad, debido probablemente a una menor virulencia intrínseca, teniendo en cuenta como factor diferencial el origen de los mismos.

Si bien en este trabajo no se realizó un análisis histopatológico de órganos de peces con signología evidente de IPN y el grado aparente de lesión puede ser subjetivo y no corresponder a la lesión a nivel microscópico, si es un criterio de aproximación importante en terreno para el diagnóstico presuntivo de la enfermedad e importante a nivel descriptivo al relacionarlo con la mortalidad producida.

San Martín (2001) describe a la necrosis pancreática infecciosa como una virosis de curso agudo, que en situaciones experimentales presenta signología poco manifiesta debido a la pérdida de virulencia de los virus por su mantención en el laboratorio. Mansilla (2002) explica como factor de atenuación de la manifestación del virus a la temperatura utilizada, cuyo óptimo se encuentra entre 5,5°C y 16°C. En este experimento la temperatura promedio para ambas fases del experimento, alcanza un nivel cercano al rango superior (15,6°C y 15,9°C, respectivamente), existiendo mediciones en días específicos que superan este rango, pudiendo influir en el desarrollo de la enfermedad. También es

necesario mencionar que la temperatura también influye en el pez, Müller (2001) describe que las altas temperaturas permiten una mejor respuesta del sistema inmune hasta ciertos límites. Sobre 18°C se produce un estrés térmico, que unido a la baja de la saturación de oxígeno en el agua y el rápido desarrollo de flora oportunista, ejercen un efecto negativo en la salud de los peces.

La expresión de CPE en todas las muestras analizadas, como su confirmación por IFAT-IPNV ratifica la presencia viral en todos los peces inoculados, tanto los muertos y moribundos retirados de los acuarios, como los sobrevivientes al experimento. Esto indicaría la capacidad del virus para generar individuos portadores, como se describe en la literatura (Wolf, 1988; Quaglio, 1989; Stoskopf, 1993; Plumb, 1999). La ausencia de mortalidad y de virus en los individuos de los grupos control confirma la relación entre la mortalidad y la replicación del virus en las especies inoculadas.

Los resultados obtenidos permiten concluir que bajo las condiciones experimentales de este trabajo.

- Es posible reproducir la enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa tanto en *S. salar* como en *O. mykiss* al inocular la cepa VR-299 y los aislados chilenos V1190/99 y V103/98 de IPNV
- El aislado nacional V1190/99 es avirulento en concentración de 10^3 TCID₅₀/ml en *S. salar* y *O. mykiss*.
- El aislado nacional V103/98 es avirulento en concentración de 10^3 y 10^4 TCID₅₀/ml en *O. mykiss*.
- La cepa VR-299 y los aislados chilenos V1190/99 y V103/98 de IPNV tienen la capacidad de inducir el estado de portador en *S. salar* y *O. mykiss* inoculados i.p.
- La severidad de la signología clínica tanto interna como externa se ajusta a las tasas de mortalidad obtenidas durante el experimento.

7. BIBLIOGRAFÍA

AHNE, W., R. K. KELLY, H. J. SCHLOTfeldt. 1989. Fish Health Protection Strategies. Ed. Lillelund, K. y H. Rosenthal. Hamburg, Bonn.

AQUANOTICIAS INTERNACIONAL. 2003. Estadística. 15: 111.

BEBAK-WILLIAMS, J., P.E. McALLISTER, G. SMITH, R. BOSTON. 2002. Effect of fish density and number of infectious fish on the survival of rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during epidemics of infectious pancreatic necrosis. *J. Fish Dis.* 25: 715-726.

BOWDEN, T. J., D. A. SMAIL, A. E. ELLIS. 2002. Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 25: 555-563.

BUSTOS, P., P. J. MIDTLYNG, C. MAIRA. 1999. IPN: Enorme desafío para la industria salmonera. *Aquanoticias Internacional.* 48: 51.

CALDERON, Y. 1998. Determinación de la virulencia de dos cepas del virus IPN en *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*. Tesis M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.

CERNA, S. 2000. Estudio de la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en reproductores salmonídeos. Tesis M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.

DE KINKELIN, P., CH. MICHEL, P. GHITTINO. 1991. Tratado de las enfermedades de los peces, Ed. Arcibia S.A., Zaragoza.

DOBOS, P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPN). *Annual Review of Fish Diseases* 5: 25-54.

HILL, B. J., WAY K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) virus and other birna viruses. *Annual Review of Fish Diseases* 5: 55-77.

LANNAN, C. N., J. R. WINTON, J. L. FRYER. 1984. Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* 20: 671-676.

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.

Mc KNIGHT, I. J., R. J. ROBERTS. 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis . 1. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br. Vet. J.* 132: 76-86.

MENDEZ, R. 2001. Compendio de la acuicultura y la pesca de Chile. Ed. Technopress. Santiago.

MÜLLER, M. 2001. Estudio de seguridad y desarrollo de anticuerpos anti IPN de una vacuna comercial en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.

OKAMOTO, N., T. SANO, R. P. HEDRICK, J. L. FRYER. 1983. Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and european eels virus. *J. Fish Dis.* 6: 19-25.

PLUMB, J. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

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

REED, L., H. MUENCH. A simple method for estimating fifty percents end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.

ROBERTS, R. 1989. Fish Pathology. Ed. Bailliere Tindall, London.

SAN MARTÍN, A. 2001. Evaluación de una vacuna comercial para la prevención de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia. Chile.

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

SILIM, A., M. A. S. Y. ELAZHARY, A. LAGACE. 1982. Susceptibility of Trouts of Different Species and Origins to Various Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 39: 1580-1584

STOSKOPF, M. 1993. Fish Medicine. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia.

TAKSDAL, T., K. STANGELAND, B.H. DANNEVIG. 1997. Experimental 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.

TASKDAL, T. 1999. Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in Atlantic Salmon: Infection trials pathogenesis and diagnostic methods. Thesis for partial fulfilment of the requirements for the degree of Dr. Med. Vet. Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo. Norway.

VILLEGAS, P., G. PURCHASE. 1980. Isolation and identification of avian pathogens. Creative Printing Company. New York.

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

ANEXO N°1
MORTALIDAD EN *S. salar*.

Tabla N°2: Mortalidad en tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con tres concentraciones de la cepa VR-299 del virus IPN.

Día	GRUPO		
	10 ^{3*}	10 ^{4*}	10 ^{5*}
9	2	0	5
10	6	2	9
11	2	4	2
12	1	5	0
13	0	2	1
14	1	1	0
16	0	1	0
20	0	1	0
22	0	0	1
24	1	0	0
Total	13	16	18

*TCID₅₀/ml

Tabla N°3: Mortalidad en tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con tres concentraciones del aislado Chileno V103/98 del virus IPN.

Día	GRUPO		
	10 ^{3*}	10 ^{4*}	10 ^{5*}
6	0	1	0
10	0	0	1
21	1	0	0
41	0	0	1
51	0	0	1
Total	1	1	3

*TCID₅₀/ml

Tabla N°4: Mortalidad en tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con tres concentraciones del aislado Chileno V1190/99 del virus IPN.

Día	GRUPO		
	10 ³ *	10 ⁴ *	10 ⁵ *
29	0	1	0
35	0	2	0
37	0	3	0
38	0	1	1
41	0	0	3
43	0	0	1
46	0	0	1
Total	0	7	6

*TCID₅₀/ml

ANEXO N°2
MORTALIDAD EN *O. mykiss*.

Tabla N°5: Mortalidad en tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con con tres concentraciones de la cepa VR-299 del virus IPN.

Día	GRUPO		
	10 ^{3*}	10 ^{4*}	10 ^{5*}
26	0	2	0
30	0	1	0
32	1	1	0
34	0	0	2
37	1	0	1
38	0	1	0
40	0	0	1
Total	2	5	4

*TCID₅₀/ml

Tabla N°6: Mortalidad en tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con con tres concentraciones del aislado Chileno V103/98 del virus IPN.

Día	GRUPO		
	10 ^{3*}	10 ^{4*}	10 ^{5*}
5	0	0	1
11	0	0	1
26	0	0	2
35	0	0	2
37	0	0	1
49	0	0	1
Total	0	0	8

*TCID₅₀/ml

Tabla N°7: Mortalidad en tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con tres concentraciones del aislado Chileno V1190/99 del virus IPN.

Día	GRUPO		
	10 ^{3*}	10 ^{4*}	10 ^{5*}
5	0	1	0
11	0	0	2
Total	0	1	2

*TCID₅₀/ml

ANEXO N°3
FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS EXTERNOS EN
***S. salar*.**

Tabla N°8: Signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=13*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=14*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=18*	
Hallazgo	n**	n**	n**	
Oscuro dorsalmente	3	3	6	12
Branquias pálidas	4	3	4	11
Distensión abdominal	2	1	2	5
Exoftalmia	1	0	3	4
Hemorragia en aletas	3	2	2	7

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°9: Signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con el aislado Chileno V103/98 del virus IPN

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=1*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=3*	
Hallazgo	n **	n **	n **	
Oscuro dorsalmente	0	1	0	1
Branquias pálidas	0	0	2	2
Distensión abdominal	0	0	0	0
Exoftalmia	0	0	0	0
Hemorragia en aletas	0	0	1	1

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°10: Signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con el aislado Chileno V1190/99 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=7*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=6*	
Hallazgo	n **	n **	n **	
Oscuro dorsalmente	0	2	4	6
Branquias pálidas	0	2	6	8
Distensión abdominal	0	1	0	1
Exoftalmia	0	1	1	2
Hemorragia en aletas	0	4	2	6

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

ANEXO N°4
FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS EXTERNOS EN
***O. mykiss*.**

Tabla N°11: Signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=2*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=5*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=4*	
Hallazgo	n**	n**	n**	
Oscuro dorsalmente	1	1	2	4
Branquias pálidas	0	3	2	5
Distensión abdominal	0	1	0	1
Exoftalmia	1	0	0	1
Hemorragia en aletas	0	2	1	3

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°12: Signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con el aislado Chileno V103/98 del virus IPN

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=8*	
Hallazgo	n **	n **	n **	
Oscuro dorsalmente	0	0	2	2
Branquias pálidas	0	0	3	3
Distensión abdominal	0	0	0	0
Exoftalmia	0	0	0	0
Hemorragia en aletas	0	0	1	1

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°13: Signos clínicos externos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con aislado Chileno V1190/99 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=1*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=3*	
Hallazgo	n **	n **	n **	
Oscuro dorsalmente	0	0	0	0
Branquias pálidas	0	1	2	3
Distensión abdominal	0	0	1	1
Exoftalmia	0	0	0	0
Hemorragia en aletas	0	0	1	1

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

ANEXO N°5
FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS INTERNOS EN
***S. salar*.**

Tabla N°14: Signos clínicos internos encontrados a la necropsia en los tres grupos experimentales de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=13*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=14*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=18*	
Hallazgo	n**	n**	n**	
Ascitis	2	2	0	0
Hígado pálido	1	5	4	10
Esplenomegalia	0	0	2	2
Riñón inflamado	3	0	0	3
Enteritis	6	9	5	20
Petequias en ciegos	5	10	12	27

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°15: Signos clínicos internos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con el aislado Chileno V103/98 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=1*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=1*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=3*	
Hallazgo	n**	n**	n**	
Ascitis	0	1	0	1
Hígado pálido	1	0	2	3
Esplenomegalia	0	0	0	0
Riñón inflamado	0	0	1	1
Enteritis	1	1	1	3
Petequias en ciegos	1	1	2	4

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°16: Signos clínicos internos encontrados a la necropsia en los tres grupos de *S. salar* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,6°C promedio e inoculados intraperitonealmente con el aislado Chileno V1190/99 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=7*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=6*	
Hallazgo	n **	n **	n **	
Ascitis	0	0	0	0
Hígado pálido	0	3	4	7
Esplenomegalia	0	2	2	4
Riñón inflamado	0	0	0	0
Enteritis	0	5	5	10
Petequias en ciegos	0	4	12	16

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

ANEXO N°6

**FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS INTERNOS EN
O. mykiss.**

Tabla N°17: Signos clínicos internos encontrados a la necropsia en lo tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con la cepa VR-299 del virus IPN.

Hallazgo	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=2*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=5*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=4*	
	n **	n **	n **	
Ascitis	1	1	0	2
Hígado pálido	1	2	2	5
Esplenomegalia	0	4	0	4
Riñón inflamado	2	1	1	4
Enteritis	2	3	4	9
Petequias en ciegos	1	2	2	5

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°18: Signos clínicos internos encontrados a la necropsia en lo tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con el aislado Chileno V103/98 del virus IPN

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=8*	
Hallazgo	n**	n**	n**	
Ascitis	0	0	3	3
Hígado pálido	0	0	2	2
Esplenomegalia	0	0	4	4
Riñón inflamado	0	0	0	0
Enteritis	0	0	8	8
Petequias en ciegos	0	0	3	3

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

Tabla N°19: Signos clínicos internos encontrados a la necropsia en lo tres grupos de *O. mykiss* de 10 a 15 gr mantenidos en agua dulce a 15,9°C promedio e inoculados intraperitonealmente con aislado Chileno V1190/99 del virus IPN.

	GRUPO			Total
	10 ³ TCID ₅₀ /ml N=0*	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml N=1*	10 ⁵ TCID ₅₀ /ml N=3*	
Hallazgo	n**	n**	n**	
Ascitis	0	1	1	2
Hígado pálido	0	1	1	2
Esplenomegalia	0	1	2	4
Riñón inflamado	0	1	2	3
Enteritis	0	1	3	4
Petequias en ciegos	0	0	0	0

*N=Mortalidad

**n= Frecuencia de presentación

EXAMENES ADICIONALES.

OBSERVACIÓN EN FRESCO:

EXAMEN BACTERIOLÓGICO:

TINCIÓN GRAM:

TINCIÓN GIEMSA:
Frotis de Sangre () :

EXAMEN VIROLÓGICO

Cultivo en células CHSE-214 en dilución 1:10 y 1:100 a 15°C, pasaje cada 7 días

Primer pasaje:

Segundo pasaje:

Tercer pasaje:

HISTOLOGÍA:

DIAGNÓSTICO:

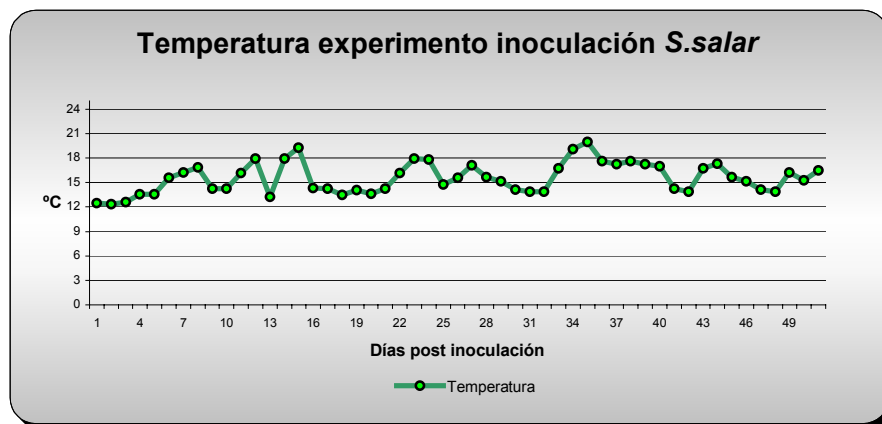
COMENTARIO:

ANEXO 8 TEMPERATURA INOCULACIÓN EXPERIMENTAL EN *S. salar*

Tabla N°20: Temperatura promedio diaria post-inoculación de IPNV en *S. salar*

Día	Temperatura promedio (°C)
1	12,5
2	12,35
3	12,57
4	13,57
5	13,57
6	15,56
7	16,25
8	16,87
9	14,25
10	14,25
11	16,18
12	17,93
13	13,25
14	17,93
15	19,25
16	14,31
17	14,25
18	13,5
19	14,06
20	13,62
21	14,25
22	16,18
23	17,93
24	17,8
25	14,75
26	15,56
27	17,12
28	15,62
29	15,12

Día	Temperatura promedio (°C)
30	14,12
31	13,87
32	13,87
33	16,75
34	19,06
35	20
36	17,62
37	17,25
38	17,62
39	17,25
40	17
41	14,25
42	13,87
43	16,75
44	17,31
45	15,62
46	15,12
47	14,12
48	13,87
49	16,25
50	15,25
51	16,5
Promedio	15,56

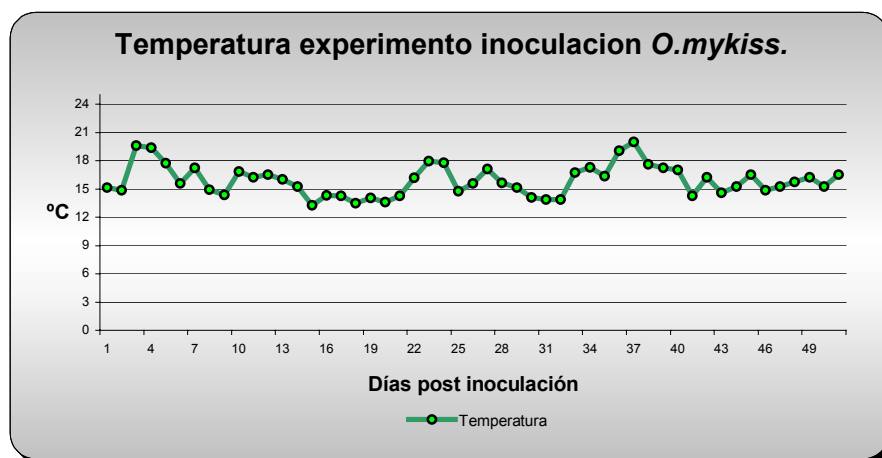


ANEXO 9
TEMPERATURA INOCULACIÓN EXPERIMENTAL EN *O. mykiss*.

Tabla N°21: Temperatura promedio diaria post-inoculación de IPNV en *O. mykiss*.

Día	Temperatura promedio (°C)
1	15,12
2	14,87
3	19,62
4	19,37
5	17,75
6	15,56
7	17,25
8	14,93
9	14,37
10	16,87
11	16,25
12	16,5
13	16
14	15,25
15	13,25
16	14,31
17	14,25
18	13,5
19	14,06
20	13,62
21	14,25
22	16,18
23	17,93
24	17,8
25	14,75
26	15,56
27	17,12
28	15,62
29	15,12

Día	Temperatura promedio (°C)
30	14,12
31	13,87
32	13,87
33	16,75
34	17,31
35	16,37
36	19,06
37	20
38	17,62
39	17,25
40	17
41	14,25
42	16,25
43	14,62
44	15,25
45	16,5
46	14,87
47	15,25
48	15,75
49	16,25
50	15,25
51	16,5
Promedio	15,90



ANEXO N°10
TÉCNICA IFAT-IPNV

1. **Fijación:** El tapiz celular se fija con ayuda de una solución de isopropanol. Eliminar el medio de cultivo y añadir 500µl de medio de fijación por pocillo. Incubar el preparado por 20 minutos a 4°C y a continuación eliminar este medio
2. **Lavado de la placa:** Distribuir 1ml de solución de lavado en cada pocillo, esperar unos minutos y retirar la solución, repetir esta operación.
3. **Adición de anticuerpo monoclonal:** Antes de iniciar el test, diluir la solución principal 20 veces con la ayuda de la solución de lavado. Distribuir la solución de anticuerpos monoclonales diluida a razón de 200µl por pocillo e incubar el preparado por una hora a temperatura ambiente.
4. **Lavado de placa:** Según lo señalado en paso 2.
5. **Adición del conjugado:** Antes de iniciar la operación, diluir la solución madre 20 veces con ayuda de la solución de dilución del conjugado. Distribuir la solución diluida a razón de 200µl por pocillo e incubar el preparado por una hora a temperatura ambiente.
6. **Lavado de placa:** Según lo señalado en paso 2
7. **Adición del medio de montaje:** Distribuir 500µl de medio de montaje por pocillo.
8. **Lectura de resultados:** Observar la placa con un microscopio de epifluorescencia. En caso de presencia de IPNV en las muestras, se podrá observar que las células infectadas presentan una fluorescencia citoplasmática verde.