

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

**“EVALUACIÓN DE LA POTENCIA DE UNA VACUNA EXPERIMENTAL PARA LA
PREVENCIÓN DE LA NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPN) EN
SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*)”**

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

PEDRO JOSÉ NAVARRETE GONZÁLEZ

VALDIVIA – CHILE

2004

ÍNDICE

	Página.
1. Resumen	1
2. Summary	2
3. Introducción	3
4. Material y método	8
5. Resultados	13
6. Discusión	20
7. Bibliografía	25
8. Anexos	29

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Ricardo Enríquez S.

Firma

PROFESOR COLABORADOR:

Sra. Mónica Monrás S.

Firma

PROFESORES CALIFICADORES:

Dr. Enrique Paredes H.

Firma

Dr. Patricio Esquivel S.

Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 29 de Marzo de 2004.

1. RESUMEN

“Evaluación de la potencia de una vacuna experimental para la prevención de la Necrosis pancreática infecciosa (IPN) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)”

En el proceso productivo del salmón, la prevención y control de las enfermedades infectocontagiosas es de importancia fundamental en la eficacia y eficiencia del sistema. Así, la presentación de enfermedades, como la Necrosis pancreática infecciosa (IPN), ocasiona importantes pérdidas por las altas mortalidades producidas. El presente estudio evalúa un producto experimental para la prevención de IPN utilizando las pruebas de potencia y seroneutralización.

En la prueba de potencia se formaron 8 grupos con 35 peces cada uno, los cuales se clasificaron en 2 categorías: vacunados (4 grupos) y no vacunados (4 grupos). Cada categoría fue conformada por 2 grupos mantenidos en agua dulce y 2 grupos en agua salada (26‰), cumpliéndose así la duplicidad del experimento. El grupo de peces vacunados fue inoculado con 0,2 ml del producto experimental y el grupo de peces no vacunados se inoculó con 0,2 ml de solución fisiológica estéril al 0,85% NaCl, vía intraperitoneal (i.p.). Cumplido el mínimo de 500° día se procedió a realizar el desafío a todos los peces. El desafío consistió en la inoculación de 0,15 ml i.p. de un aislado nacional del virus de la Necrosis pancreática infecciosa (IPNV), con un título de $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml. Se registró la mortalidad durante el experimento y se realizó cultivo celular e IFAT-IPN para confirmar la causa de muerte.

El título de anticuerpos neutralizantes se obtuvo a partir de la prueba de seroneutralización, para la cual se formaron 2 grupos con 35 peces cada uno, ambos mantenidos con agua salada (26‰). Uno de ellos con peces vacunados y otro con peces no vacunados (vía de inoculación y dosis iguales a prueba de potencia). Se extrajo suero en “pools” de 5 peces de cada grupo cada 14 días, desde el día 0 hasta el día 84, postvacunación. Se registró la temperatura y algunos parámetros del agua durante el experimento.

La evaluación se realizó a través del cálculo del Porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS). El producto analizado muestra ser efectivo a partir de los resultados de RPS (83,4%) registrados en los grupos de agua dulce. Sin embargo, en los grupos de agua salada los resultados obtenidos mostraron un valor deficiente de RPS (67,66%). Los resultados de la prueba de seroneutralización indican altos títulos de anticuerpos neutralizantes para el virus IPN en *Salmo salar*.

Palabras clave: vacuna, IPN, salmón Atlántico.

2. SUMMARY.

“Potency evaluation of an experimental vaccine for the prevention of the Infectious pancreatic necrosis (IPN) in Atlantic salmon (*Salmo salar*).”

In the salmon farming process, prevention and control of infectious diseases are of major importance in the efficacy and efficiency of the system. The outbreak of diseases, as infectious pancreatic necrosis (IPN), produces important economic losses because of its high mortality. This study evaluates an experimental product for the prevention of IPN by using the potency and serum neutralization test.

For the potency test 8 fish tanks were set up, containing 35 fishes each, which were classified into two groups: vaccinated (4 tanks) and non-vaccinated (4 tanks). Each experimental consisted of 2 fish tanks with fresh water and 2 with sea water (26‰), fulfilling the duplicity in the experiment. The vaccinated group was inoculated with 0.2 ml of the experimental product and the non-vaccinated group with 0.2 ml of sterile saline (0.85% NaCl), intraperitoneally (i.p.). All fish were challenged at a minimum of 500 degree days. The challenge was carried out using 0.15 ml i.p. of a national isolated infectious pancreatic necrosis virus, having a title of $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml. Mortality during the experiment was registered and a cell culture and IFAT-IPN was performed in order to confirm the cause of death.

For the serum neutralization test 2 fish tanks were used with sea water (26‰) 35 fishes containing each. One of them with vaccinated fishes while the other contained non vaccinated control fishes (the same protocol of inoculation as described for the potency test was used). Sera were collected as pools of 5 fishes from each tank every 14 days, from day 0 to day 84 post vaccination. Temperature and other parameters from the water were registered during the experiment.

Evaluation was estimated by determining the relative percentage of survival (RPS). The product analyzed showed to be effective when RPS values were obtained in fresh water (83.4%). However, the results obtained in fish tanks with sea water showed a low RPS (67.66%). Results show that the serum neutralization test hi titers of neutralizing antibodies to the virus IPN was determinated.

Key words: vaccine, IPN, Atlantic salmon

3. INTRODUCCIÓN.

Para mantener los excelentes resultados económicos observados en el cultivo de salmonídeos, las empresas están aplicando mayor tecnología en busca de mayor eficiencia en el proceso productivo. Uno de sus objetivos ha sido realizar actividades que entreguen información para conocer y controlar las enfermedades que causan las mayores pérdidas. Si bien no es el único factor de importancia, la experiencia en muchos lugares del mundo ha demostrado que las enfermedades de los peces juegan un papel preponderante en el resultado económico de un establecimiento de acuicultura (Smith y col., 2002). El nivel de productividad alcanzado por la industria del salmón no hubiera sido posible si el país no ostentara las condiciones naturales propicias, caracterizadas por la disponibilidad de extensas zonas marinas costeras, lacustres y fluviales que ofrecen óptimas condiciones ambientales para el cultivo de estas especies, en gran parte libres de contaminación y suficientes horas luz en épocas invernales (Méndez, 1998).

Las enfermedades más comunes son las causadas por agentes bacterianos, parasitarios y virales. De estos últimos inquieta su dificultad de tratamiento, ya que la mayoría de las epidemias son agudas o subagudas y además se carece de un tratamiento quimioterapéutico para ellas (Sano, 1995).

La Necrosis pancreática infecciosa (IPN) (Roberts, 1989) es una enfermedad viral altamente contagiosa (Post, 1983), caracterizada como una enfermedad subaguda de salmonídeos, que afecta a peces jóvenes y cursa con alteración del páncreas e intestino, siendo característica la enteritis catarral (Plumb, 1999), provocando en los peces afectados deficiencia en la conversión de alimentos y mortalidad (Wolf, 1988). Esta enfermedad está distribuida en todo el mundo. Existen comunicados de aislamiento del agente en a lo menos 22 países, en Asia, Europa, Norteamérica y Sudamérica (Plumb, 1999).

La enfermedad es causada por un Birnavirus miembro de la familia Birnaviridae y se incluye dentro del grupo de los Aquabirnavirus (Plumb, 1999). La familia Birnaviridae se caracteriza por poseer genoma con doble cadena de RNA (Quaglio, 1989). El agente se caracteriza por no poseer envoltura (Roberts, 1989), reproducirse en el citoplasma, ser de forma icosaédrica, medir 58 a 60 nm de diámetro y tener un peso molecular entre 55×10^6 a 81×10^6 KD. La cápside se compone de 180 subunidades estructurales triangulares reunidas dentro de 92 capsómeros pentagonales y hexagonales (Quaglio, 1989).

Existen nueve serotipos que varían en su grado de virulencia, pero que reaccionan en forma cruzada al test de seroneutralización. Los serotipos más comunes en Europa son el Ab y Sp, siendo patógeno sólo el Sp. En Norteamérica, el serotipo predominante es el VR299. Los distintos serotipos aislados se denominan de acuerdo al lugar geográfico en el que fueron aislados. El serotipo VR299 o WB fue aislado en West Buxton (EE.UU.) y los serotipos Ab y Sp en Abild y Spjarup (Dinamarca), respectivamente (Plumb, 1999). En Chile se encuentran

presentes los dos serotipos más patógenos: el Sp y el VR299, siendo predominante en la zona central el de origen norteamericano y en la zona sur el de origen europeo (Cárcamo, 2002).

El virus IPN ha sido aislado tanto en especies de agua dulce como de agua salada, incluyendo invertebrados (Plumb, 1999). El virus usualmente es aislado de portadores desde riñón (porción anterior), bazo, hígado, ciegos pilóricos y gónadas (Quaglio, 1989).

La transmisión horizontal ocurre a consecuencia de secreciones y excreciones que contienen el virus y que son excretados al medio ambiente con las heces, orina y productos sexuales tanto del macho como de la hembra (Stoskopf, 1993). El origen más importante de la infección del IPN es el fluido ovárico de hembras portadoras y descarga intestinal por parte de casos clínicos de la enfermedad (Post, 1983). El virus ingresa mediante diferentes vías: branquias o directamente por erosiones y/o heridas de la piel (Stoskopf, 1993).

La resistencia a la infección viral se correlaciona con el desarrollo de la inmunocompetencia. Altos niveles de anticuerpos en peces portadores coinciden con reducidos títulos del virus en órganos y heces (Stoskopf, 1993). Una importante característica de IPN es el incremento de la resistencia que experimentan los peces a partir del quinto mes de vida (Quaglio, 1989). Sin embargo, la infección en la mayor parte de las especies de salmonídeos puede tener lugar a cualquier edad en aquellos peces que no hayan estado previamente expuestos al virus, situación que se evidencia a partir de respuestas conductuales acompañadas por una depresión en la producción de anticuerpos asociado a la condición de estrés (Roberts, 1989).

El virus IPN aislado de salmonídeos se replica entre 10 – 26 °C, perdiendo ésta capacidad con temperaturas menores a 4 °C y mayores a 30 °C (Stoskopf, 1993).

El agente posee gran resistencia ante los cambios en el medio ambiente, como también a solventes orgánicos por no poseer envoltura (Reno, 2000). La infectividad del virus es inactivada por los agentes desinfectantes comúnmente usados en cultivos de peces como cloro, formalina, yodo y pH 12,5; el pH 2,5 produce inactividad incompleta favoreciendo la infectividad del virus y su perpetuidad y transporte en el tracto gastrointestinal anterior (Wolf, 1988).

La transmisión vertical es a través de las ovas, localizándose el agente en el exterior de la ova dadas sus características anatómicas. Sin embargo, el virus puede penetrar hacia el interior de la ova a través del proceso de la fecundación o durante el endurecimiento a través de la hidratación (Quaglio, 1989). La desinfección con iodóforos de las ovas fertilizadas no evita totalmente la transmisión del virus a la progenie, debido a que puede encontrarse dentro de la ova. Experimentos realizados con el virus IPN, demostraron que éste puede persistir en la superficie de la ova hasta infectar horizontalmente al alevín en el momento de la eclosión, favoreciendo el desarrollo de inmunotolerancia, ya que la maduración del sistema inmune de los salmonídeos se realiza posteclosión (Ahne y col., 1989).

El curso agudo de la enfermedad se presenta en individuos susceptibles y en etapas juveniles, caracterizándose por manifestar todos los signos y lesiones que produce la enfermedad siendo la enteritis y la necrosis del páncreas los hallazgos comúnmente encontrados (Wolf, 1988). En salmonídeos la infección aguda ocurre entre 1 y 4 meses de edad y puede llegar a una mortalidad de un 100%. Peces de 6 meses de edad o mayores experimentan infección subclínica o inaparente, no notándose mayores pérdidas (Stoskopf, 1993).

Se describe una tercera forma de transmisión a través de vectores animados e inanimados: equipamiento, cursos de agua (McAllister y Bebak, 1997), medios de transporte, aves (patos y garzas) o mamíferos depredadores (ratas, nutrias y visones) (Quaglio, 1989) y peces silvestres, transformándose en reservorios naturales del agente.

Experimentalmente, el virus IPN puede ser transmitido por inyección, inmersión y por la alimentación (Post, 1983). La virulencia y el período de incubación que se ha observado en laboratorio dependen de la especie y edad del pez, la forma de exposición, el serotipo viral y la exposición pasada del pez al agente (Stoskopf, 1993).

En el pez afectado se observa externamente pigmentación oscura, cierto grado de exoftalmia, distensión abdominal, petequias en zona ventral y aletas ventrales, branquias pálidas, pseudofecas (Wolf, 1988), nado errático, rotación sobre su propio eje y/o movimientos violentos (Stoskopf, 1993), asociados a signología nerviosa (Roberts, 1989). Peces gravemente afectados caen al fondo del estanque o se dejan llevar por la corriente (Post, 1983). Dentro de los signos clínicos internos se encuentra el bazo, corazón, hígado y riñón anormalmente pálidos; el tracto gastrointestinal sin alimento, siendo característica la presencia de un fluido mucoide (Stoskopf, 1993) de coloración blanquecina (Wolf, 1988). Salmonídeos jóvenes con IPN agudo o subagudo usualmente muestran pérdida de peso y anemia (Post, 1983), encontrándose deprimidos los valores del hematocrito (Stoskopf, 1993).

Histológicamente, la lesión más importante es la necrosis de la célula pancreática, presentando cuerpos de inclusión en el citoplasma. En los peces portadores (sobrevivientes) el páncreas presenta fibrosis, con la subsecuente restricción en la producción de enzimas pancreáticas, lo que conlleva un deterioro en el crecimiento y en la conversión de alimentos, llegando en casos extremos a caquexia de los individuos (Quaglio, 1989).

El diagnóstico presuntivo puede basarse en los signos de la enfermedad, edad, especie, localización geográfica del problema (Stoskopf, 1993), histopatología e historia de la patología en la población de peces (Post, 1983). Sin embargo, el diagnóstico definitivo se puede realizar sólo con el aislamiento del virus o por pruebas serológicas como: Fijación de complemento, Seroneutralización, Hemoaglutinación, Inmunolectroforesis (Stoskopf, 1993), Inmunofluorescencia y Elisa (Quaglio, 1989). Los órganos de elección para muestreo virológico en peces portadores son riñón, páncreas, bazo e hígado, en orden de prioridad. El fluido ovárico y seminal puede utilizarse en ejemplares vivos (McAllister y col., 1987). La seroneutralización es un método eficiente para el diagnóstico de enfermedades virales y

consiste en la reacción in vitro del complejo inmune. El título de anticuerpos se calcula de acuerdo a las diluciones que reaccionan durante la prueba.

El aislamiento del virus se realiza a partir de macerado de órganos de peces sospechosos de IPN mezclados con antibióticos e inoculados en líneas celulares susceptibles (Plumb, 1999). El virus se cultiva sobre una gran variedad de líneas celulares permanentes, siendo las más comunes: RTG-2, CHSE-214, BF-2 (Roberts, 1989; Plumb, 1999; Stoskopf, 1993), FHM (Roberts, 1989) y PG (Stoskopf, 1993). Entre 15 y 20°C el daño celular (efecto citopático) se manifiesta en un espacio de tiempo que en función del tamaño del inóculo y de la cepa viral, varía entre uno y veinte días postinoculación (Roberts, 1989).

La vacunación es una de las herramientas de mayor eficacia en la prevención de enfermedades en cualquier programa de salud animal. Los primeros reportes sobre vacunaciones contra el virus IPN, a fines de la década del 70, reportaban bajos niveles de anticuerpos circulantes (Dorson, 1981). La vacuna ideal contra el virus IPN debe inducir temprana protección, prevenir la formación de portadores, inducir inmunidad contra un gran número de serotipos, producir una restitución más rápida de los peces enfermos y estimular la formación de anticuerpos protectores (Leong y Fryer, 1993).

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

La potencia de una vacuna puede ser medida por diversos modelos experimentales y los más usados son los siguientes: (Amend, 1981).

- Dosis desafío constante y dosis de la vacuna constante.
- Dosis desafío constante con dosis graduadas de la vacuna.
- Dosis desafío graduadas con dosis constantes de la vacuna.
- Dosis desafío graduadas con dosis graduadas de la vacuna.

Para la determinación de la potencia de una vacuna existen métodos mediante los cuales se evalúa su eficacia, algunos son:

- Porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS).
- Aumento de la dosis letal 50 (DL50).
- Aumento en el título de anticuerpos específicos neutralizantes.

El Porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS) es un método adecuado para evaluar en forma objetiva los resultados de una vacuna. Consiste en desafiar a dos grupos de peces (vacunados y no vacunados) con un aislado virulento del patógeno en estudio. Los datos de

mortalidad obtenidos en el estudio son analizados a partir de una fórmula matemática (RPS) que entrega la sobrevivencia atribuible a la vacunación (Nordmo, 1997).

La forma de abordar un problema sanitario debe incluir como inicio el concepto preventivo, en donde la vacunación debe ser considerada como una herramienta individual, lo que asegura la inmunocompetencia a toda la población inoculada. Mediante el estudio realizado se pretende contribuir para lograr mayor información respecto de la prevención de IPN abordado como un problema latente y la vacunación como herramienta preventiva, citando parte de la información disponible y demostrando de manera objetiva la evaluación de un producto determinado previo a su utilización.

HIPÓTESIS.

- “Los peces vacunados con el producto experimental desarrollan elevados títulos de anticuerpos contra antígenos virales, que los protegen de la acción del virus de la Necrosis pancreática infecciosa”.

OBJETIVOS.

- Evaluar la potencia de una vacuna experimental en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) para la prevención de la Necrosis pancreática infecciosa, mediante el método de Porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS).
- Determinar el título de anticuerpos neutralizantes a través de la prueba de seroneutralización para el mismo producto experimental y especie.

4.- MATERIAL Y MÉTODO.

4.1.- Peces.

Los peces utilizados en el estudio correspondieron a 380 ejemplares de la especie Salmón del atlántico (*Salmo salar*) de la cepa Landcatch de desove nacional, con un peso entre 15 a 18 g, obtenidos desde un centro de cultivo sin anamnesis de vacunación, ubicado en el sector de Hueyusca, X Región, Chile.

4.2.- Transporte y adaptación de los peces.

Los peces fueron transportados desde su origen por medio de estanques con aireación constante (oxigenación) y ubicados luego para su adaptación en un estanque de 500 l de la Sala de Estanques del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, donde permanecieron durante dos semanas previo al inicio del estudio.

4.3.- Chequeo sanitario.

Se tomaron muestras de 30 peces elegidos al azar, a partir del lote proveniente del centro citado, con el objeto de descartar algún proceso infeccioso en el lote. Los peces fueron examinados externa e internamente observando continuidad de la piel, pérdidas de escamas, integridad de opérculos y aletas, coloración de branquias, tamaño, peso y estado nutricional. Así mismo, se examinaron los órganos en busca de algún tipo de alteración. Las muestras obtenidas fueron enviadas al Laboratorio de Ictiopatología para realizar exámenes virológicos, bacteriológicos y parasitológicos, según procedimientos de la OIE (2000). Para virología se tomaron muestras de riñón y bazo inoculándose en células CHSE-214, a 15°C, realizando 3 pasajes de 7 días cada uno. Se sembraron muestras de riñón de cada pez en agar TSA (agar soya-tripticosa), incubado a 20 – 22°C por 5 días y en agar MAO ambos para el diagnóstico bacteriano. Se utilizó además la tinción Gram para el mismo propósito. A partir de muestras de branquias observadas al microscopio, se examinó su integridad y la presencia de parásitos.

4.4.- Mantención de los peces.

Los peces fueron mantenidos durante todo el estudio en la Sala de Acuarios del Laboratorio de Ictiopatología, en acuarios de 80 l con recirculación de agua, cada uno con un sistema de filtros de carbón activado y aireación constante. El recambio de agua se realizó dos veces por semana.

Durante el estudio los peces se mantuvieron con fotoperíodo de 24 horas. La alimentación se realizó tres veces al día con un alimento comercial y correspondió al 2.5% del peso corporal por día, cantidad suficiente para los requerimientos de mantención de los peces.

4.5.- Virus.

Se trabajó con un aislado nacional del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), con un título de $10^{6,5}$ TCID₅₀/ml, identificado como 132/02, ingresado y conservado en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.6.- Titulación viral.

El proceso de titulación viral se realizó mediante el método de Reed y Muench (1938) y consistió en calcular la concentración del agente en estudio presente en una solución. Esta solución se diluye en base 10 agregando 0,1 ml del virus en 0,9 ml de MEM (Medio Esencial Mínimo) al 2% suero fetal, siendo luego depositados en una placa de 96 pocillos, cada uno de los cuales posee una monocapa de células CHSE-214 incubándose por 7 días a 15 °C. El resultado positivo de la dilución depositada se define por la presentación de efecto citopático (CPE) en las células sembradas, daño celular atribuible al agente en cuestión. El título viral se obtiene a partir de la mayor dilución capaz de producir CPE.

4.7.- Vacuna.

El producto experimental utilizado correspondió a un emulsionado de una vacuna bivalente (IPNV-SRS) y un adyuvante de aceite mineral, y se inoculó intraperitonealmente (i.p.) a cada uno de los peces del grupo vacunados en dosis de 0,2 ml del producto. Los peces controles fueron inoculados con solución salina estéril al 0,85% NaCl, en dosis de 0,2 ml de producto por vía i.p.

4.8.- Desafío.

El desafío se realizó a la totalidad de los acuarios, respetándose las Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) mínimas requeridas por el fabricante del producto y que corresponde a 500° día tiempo mínimo para desarrollar la respuesta inmunitaria en los peces.

La inoculación del virus se realizó en dosis de 0,15 ml por pez, vía intraperitoneal, a las UTA mínimas recomendadas por el fabricante.

4.9.- Toma de muestras.

A todos los peces muertos y moribundos durante el estudio, se les realizó la necropsia correspondiente. Posterior a los exámenes externo e interno, se procedió a la toma de muestras, extrayendo trozos de riñón y bazo de cada pez equivalente a 1 g, colocándolos en un tubo con 9 ml de MEM (muestras para virología) (Winton, 1992).

4.10.- Células.

Para el diagnóstico del virus IPN, se trabajó en el laboratorio con la línea celular CHSE-214. La temperatura de mantención y crecimiento celular fue de 20°C y para la inoculación viral de 15°C. El inóculo viral se depositó en una monocapa celular usando un medio de cultivo MEM. Se agregó suero fetal bovino en un 2% en el caso de cultivo celular. Para prevenir contaminación bacteriana secundaria se usó: penicilina y estreptomycinina en concentraciones de 100UI/ml y 100µg/ml, respectivamente.

4.11.- Prueba de potencia.

Luego de obtenidos los resultados del chequeo sanitario, se tomaron 280 peces y se dividieron en 8 acuarios con 35 peces cada uno. El experimento se realizó en 2 tipos de agua: agua dulce y agua salada (salinidad de 26‰). Los 8 acuarios se clasificaron en dos grupos: vacunados (4 acuarios) y no vacunados (4 acuarios), cada grupo en duplicado (Tabla N°1).

Tabla N°1: Distribución de acuarios de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15 – 18 g vacunados y no vacunados, para la evaluación de una vacuna experimental.

VACUNADOS				NO VACUNADOS			
Acuario	N° peces	Vacuna	Ambiente	Acuario	N° peces	Solución	Ambiente
A	35	0,2 ml i.p.	Agua dulce	E	35	0,2 ml i.p.	Agua dulce
B	35	0,2 ml i.p.	Agua dulce	F	35	0,2 ml i.p.	Agua dulce
C	35	0,2 ml i.p.	Agua salada	G	35	0,2 ml i.p.	Agua salada
D	35	0,2 ml i.p.	Agua salada	H	35	0,2 ml i.p.	Agua salada

Luego de la inoculación de la vacuna, ambos grupos de peces se mantuvieron en condiciones similares hasta que alcanzaron los 500° día, tiempo mínimo recomendado por el fabricante para lograr estimular una respuesta inmune en los peces. Posterior a los 500° día se procedió a realizar el desafío de todos los peces. El desafío consistió en la inoculación de 0,15 ml de un aislado nacional del virus IPN correspondiente a $1,5 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/pez.

4.11.1.- Examen virológico.

Las muestras obtenidas durante el estudio, se llevaron al laboratorio para su procesamiento donde se maceraron en un mortero con arena estéril. El homogeneizado resultante fue extraído en un segundo tubo el cual se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C por 10 min, recuperándose luego el sobrenadante y congelándose en tubos rotulados para su utilización posterior. Luego, se realizó el proceso de inoculación viral sobre el cultivo celular (células CHSE-214) incubándose a 15°C por siete días, observándose al séptimo día en busca de CPE, detectando presencia viral (Winton, 1992).

La confirmación de la presencia viral se realizó a partir del reaislamiento del virus en cada uno de los peces moribundos y muertos desafiados, por medio de las técnicas de cultivo

celular, inoculados con muestras de órganos (riñón y bazo) y comprobados por la técnica IFAT-IPNV (Ver anexos).

4.11.2.- Cálculo del porcentaje de sobrevivencia relativo (RPS).

Para la evaluación de la prueba de potencia, se consideró la sobrevivencia atribuible a la vacunación durante el tiempo que duró el estudio. Se registraron las mortalidades del periodo, con lo cual se determinó el porcentaje de sobrevivencia relativo de la vacuna. El cálculo del RPS, se realizó mediante la siguiente fórmula (Nordmo, 1997):

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ de mortalidad del grupo vacunado}}{\% \text{ de mortalidad del grupo no vacunado}} \right) \times 100.$$

4.11.3.- Análisis de los sobrevivientes.

Se analizaron los peces sobrevivientes al experimento con el objeto de determinar la presencia o ausencia de IPNV. Cada muestra correspondió a riñón y bazo de 4 ó 5 peces (“pool” de órganos) dependiendo del número de sobrevivientes por acuario. Este análisis se realizó a través de cultivo celular y las muestras se evaluaron por presentación o no presentación de CPE.

4.12.-Prueba de seroneutralización.

Para esta prueba, cuyo objetivo es obtener la concentración de anticuerpos producidos por el producto, se tomaron muestras de sangre en grupos de 5 peces al azar por acuario cada 14 días (día 0, 14, 28, 42, 56, 70, 84 post-vacunación). El modelo experimental utilizado se presenta en la Tabla N° 2. La obtención de las muestras de sangre se realizó por punción de la vena caudal, previa anestesia de los peces con Benzocaína (BZ-20^{®1}) en dosis de 50 ppm. En el laboratorio, se realizó la extracción del suero a cada una de las muestras de sangre, para posteriormente medir la concentración de anticuerpos.

Tabla N°2: Distribución de los acuarios de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15 – 18 g y metodología de la prueba de seroneutralización para la evaluación de una vacuna experimental.

MODELO EXPERIMENTAL			
Acuario	N° peces	Inóculo	Ambiente
1	35	0,2 ml i.p. Vacuna experimental.	Agua salada
2	35	0,2 ml i.p. Solución fisiológica al 0,85% NaCl.	Agua salada

La prueba de seroneutralización tiene como objetivo estimar la concentración de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero en estudio. Para determinar la concentración de anticuerpos se utilizó virus constante y diluciones del suero (Amend, 1981). El método

¹ Laboratorio Veterquímica, Santiago, Chile.

consiste en realizar diluciones del suero en Log 2 en duplicado sobre una placa de 96 pocillos y posteriormente agregar una concentración conocida del antígeno del virus IPN. Luego, a cada pocillo se agrega el cultivo de células y se incuban por 7 días a 15 °C. Al término de la incubación, se observan las células buscando CPE. Aquellos pocillos que no presentan CPE, poseen niveles de anticuerpos que lograron neutralizar la acción del agente. El título de anticuerpos neutralizantes se estima a partir de la última dilución en la cual se neutraliza el antígeno.

4.13.- Agua.

El agua dulce utilizada se extrajo de una vertiente, y el agua salada se transportó desde el sector costero de Los Molinos, cada vez que fue necesario. El nivel de salinidad correspondió a 26‰. A lo largo del estudio, una vez por semana, se realizaron mediciones de los niveles en el agua de: oxígeno, DBO₅ y pH (Ver anexos).

Luego del recambio rutinario, el agua extraída se mantenía por 24 horas en cloro al 5%, antes de eliminarla a través de la red de evacuación.

4.14.- Temperatura.

Se realizó un registro diario de temperatura, con el objetivo de calcular las UTA durante el estudio. La temperatura del agua se midió tres veces al día, obteniendo promedios diarios. Durante la realización del estudio, los niveles de temperatura se mantuvieron constantes entre 8 °C y 12 °C.

4.15.- Laboratorio y materiales.

Durante la realización de este estudio, se utilizó el equipamiento de las dependencias del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

5.- RESULTADOS.

5.1.- Pre vacunación.

Durante el período de aclimatación que duró dos semanas, los peces manifestaron un leve cambio en su conducta provocado por el estrés del traslado. Las muestras tomadas al azar para el chequeo sanitario resultaron negativas a las pruebas virológicas, bacteriológicas y parasitológicas, siendo posible la utilización del lote en el estudio.

5.2.- Prueba de potencia.

5.2.1.- Vacunación.

En los primeros momentos post vacunación los peces se observaron letárgicos producto de la anestesia, recuperándose rápidamente.

Durante el predesafío, las muestras analizadas de riñón anterior y bazo de los peces muertos y moribundos resultaron negativas a los exámenes de virológicos y bacteriológicos (procedimientos descritos en el punto 4.3).

Los grupos vacunados agua salada y no vacunados agua salada registraron mortalidad durante este período y alcanzó al 2,85% (1/35) y 5,71% (2/35), respectivamente. Los grupos vacunados agua dulce y no vacunados agua dulce no registraron mortalidad durante el período.

5.2.2.- Desafío.

El desafío se realizó después del tiempo mínimo de 500º día requerido por el fabricante del producto, necesario para desarrollar la respuesta inmunitaria en los peces. Las UTAs registradas durante el período de pre desafío alcanzaron los 893.2º día.

Durante el desafío, que se extendió por 70 días, se realizó necropsia a cada pez muerto y moribundo, registrándose y tomando muestras de riñón anterior y bazo para cultivo celular. Los resultados de las muestras analizadas se muestran en la Tabla N°3.

Tabla N°3: Mortalidad diaria (D) y acumulada (A) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 30 – 40 g, vacunados y no vacunados con el producto experimental, posterior al desafío i.p. con el virus IPN, en agua dulce y salada.

Días Desafío	Vacunados.				No vacunados.			
	Agua dulce n:35		Agua salada n:34		Agua dulce n:35		Agua salada n:33	
	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%
0 al 9	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0
10 al 19	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	3/3	9,09
20 al 29	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	1/4	12,12
30 al 39	0/0	0,0	1/1	2,94	1/1	2,85	0/4	12,12
40 al 49	0/0	0,0	0/1	2,94	0/1	2,85	0/4	12,12
50 al 59	1/1	2,85	1/2	5,88	0/1	2,85	2/6	18,18
60 al 69	0/1	2,85	0/2	5,88	5/6	17,14	0/6	18,18
Total	1	2,85	2	5,88	6	17,14	6	18,18

D/A: Mortalidad diaria / Mortalidad acumulada.

% : Porcentaje mortalidad acumulada.

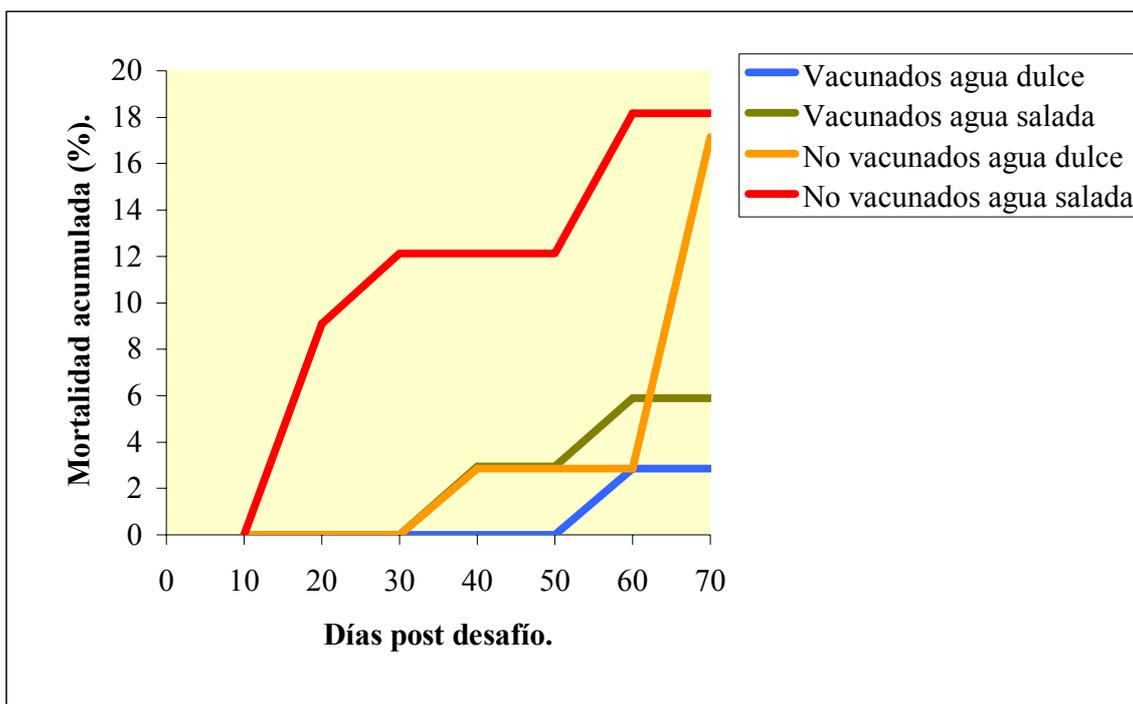


Gráfico N°1: Curvas de mortalidad acumulada porcentual en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 30 – 40 g, vacunados y no vacunados con el producto experimental, posterior al desafío i.p. con el virus IPN, en agua dulce y salada.

Según el registro de mortalidad, los porcentajes de mortalidad acumulada obtenidos durante el período posterior al desafío para los grupos vacunados agua dulce y vacunados agua salada fueron de 2,85% y 5,88%, respectivamente, a partir del día 50 post desafío y hasta el final del ensayo. Los grupos no vacunados agua dulce y no vacunados agua salada registraron un 17,14% y un 18,18% de mortalidad, respectivamente, a partir del día 60 post desafío con lo que finalizaron el experimento (Grafico N° 1).

Al examen clínico la signología de IPN fue poco manifiesta durante todo el experimento y en todos los grupos en estudio. Se observó oscurecimiento de la piel y enflaquecimiento progresivo. Previo a la muerte de los peces se observó letargia e inapetencia.

Todos los peces analizados mostraron signología de IPN caracterizada por palidez hepática, hepatomegalia, enteritis y escasa cantidad de alimento en el tracto gastrointestinal (Fig. N°1).



Fig. N°1: Petequias en ciegos pilóricos y tejido adiposo adyacente, esplenomegalia leve, palidez hepática, enteritis, ascitis serosanguinolenta en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con cuadro clínico de IPN.

Durante la prueba de potencia se analizó la mortalidad producida en forma individual, realizando el examen post mortem correspondiente y luego extrayendo muestras para virología con el fin de confirmar la muerte por IPN.

El resultado del examen virológico indicó la presentación de CPE en el 100% de los casos (Fig. N°2). Para la confirmación del diagnóstico se utilizó la Prueba de Inmunofluorescencia (IFAT-IPNV) (Fig. N°3).

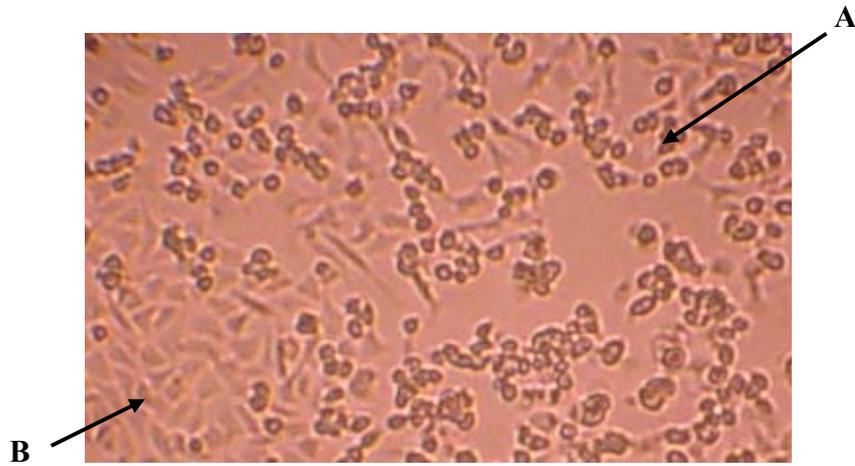


Fig. N°2: Monocapa celular de CHSE-214 infectada por el virus IPN, en la que se observa el efecto citopático (A) y zonas de tejido íntegro (B). 40X.

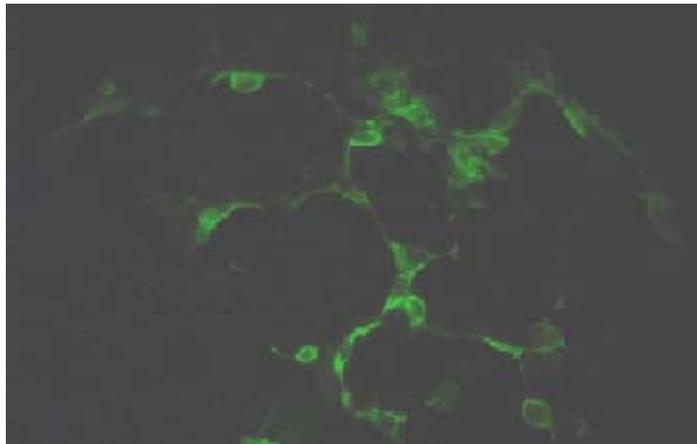


Fig. N°3: Células con fluorescencia citoplasmática específica consecuencia de infección por el virus IPN (IFAT-IPNV).

5.2.3.- Cálculo del Porcentaje de sobrevivencia relativo (RPS).

Mediante los datos obtenidos (Tabla N°3), se procedió a calcular el porcentaje de relativo sobrevivencia, posterior al desafío de los peces vacunados en agua dulce y salada de la siguiente manera:

- % mortalidad del grupo agua dulce vacunado = 8,57%
- % mortalidad del grupo agua dulce no vacunado = 17,14%

$$\text{RPS vacunados agua dulce} = \left(1 - \frac{2,85}{17,14}\right) \times 100 = 83,4$$

- % mortalidad del grupo agua salada vacunado = 5,88%
- % mortalidad del grupo agua salada no vacunado = 18,18%

$$\text{RPS vacunados agua salada} = \left(1 - \frac{5,88}{18,18}\right) \times 100 = 67,66$$

5.2.4.- Análisis de Sobrevivientes.

Al término de la prueba, los peces sobrevivientes no presentaron signos de la enfermedad, sacrificándose todos los individuos, tomando muestras colectivas de órganos para su análisis (“pools” de 4 ó 5 peces). Los resultados son registrados en la Tabla N°4.

Para la confirmación del diagnóstico se utilizó la Prueba de Inmunofluorescencia (IFAT-IPNV).

Tabla N°4: Resultados de laboratorio indicando presencia o ausencia de CPE en las muestras analizadas de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 50 – 60 g, al final del experimento, según grupo de peces.

GRUPO DE PECES	CPE	No CPE	TOTAL
Vacunados agua dulce	34	0	34
Vacunados agua salada	32	0	32
No vacunados agua dulce	25	4	29
No vacunados agua salada	4	23	27
TOTAL	95	27	122

De un total de 122 peces analizados, 95 presentaron CPE y 27 resultaron negativos. Los peces positivos correspondieron a 34 peces del grupo vacunados agua dulce, 32 peces del grupo vacunados agua salada, 25 peces del grupo no vacunados agua dulce y 4 peces del grupo no vacunados agua salada. Los peces negativos a la prueba correspondieron a 4 peces del grupo no vacunados agua dulce y 23 peces del grupo no vacunados agua salada.

5.3.- Prueba de seroneutralización.

Con el objeto de medir a través de seroneutralización la concentración de anticuerpos presentes en los peces vacunados y no vacunados con el producto experimental, se analizaron muestras de suero de peces de dos acuarios implementados para esta prueba. Esta prueba duró 84 días y las muestras fueron obtenidas cada 14 días. Los resultados obtenidos se señalan a continuación (Tabla N°5).

Tabla N°5: Promedio de los títulos de anticuerpos neutralizantes al virus IPN, en las muestras analizadas de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), en los grupos de peces experimentales.

Días Post inóculo	Acuario B Vacunados (1 : Y)	Acuario A No vacunados (1 : Y)
0	1 : 16	1 : 16
14	1 : 96	1 : 32
28	1 : 128	1 : 16
42	1 : 64	1 : 8
56	1 : 16	1 : 32
70	1 : 96	1 : 16
84	1 : 128	1 : 32

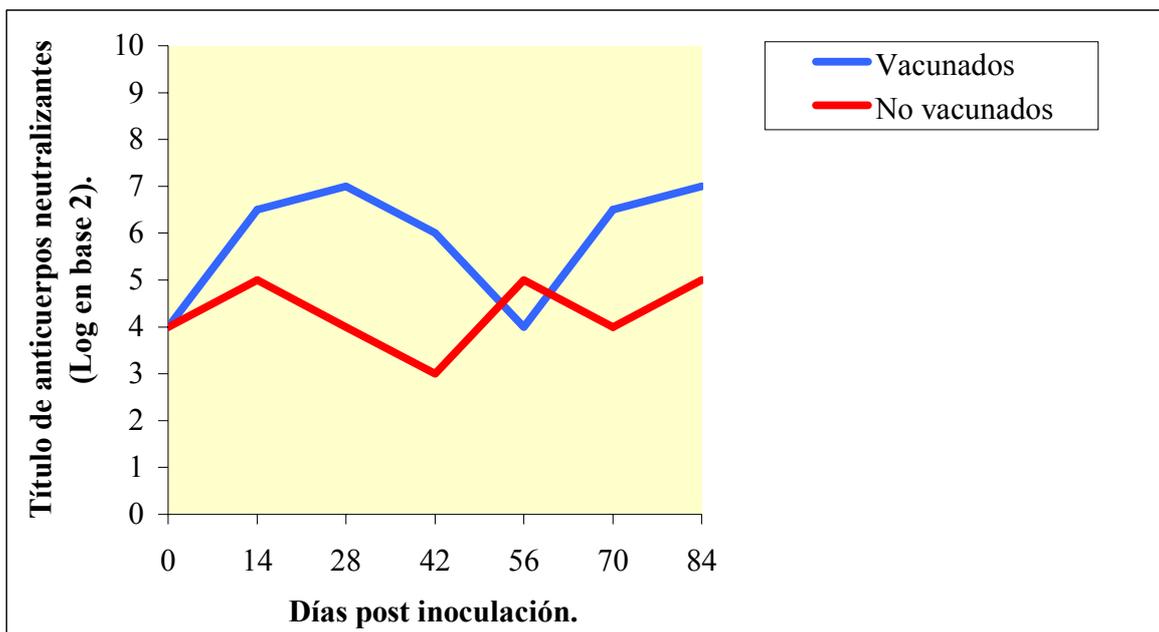


Gráfico N°2: Curvas de los promedios de los títulos de anticuerpos neutralizantes al virus IPN en las muestras de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), vacunados y no vacunados, analizadas en la prueba de seroneutralización.

Los resultados obtenidos indican los títulos de anticuerpos neutralizantes al virus IPN, de cada una de las muestras de suero analizadas, expresados en Log_2 (Gráfico N°2). El grupo de peces vacunados presentó la dilución 1:16 al inicio de la prueba (día 0), 1:96 el día 14, el día 28 alcanzó 1:128, 1:64 y 1:16 el día 42 y 56 respectivamente, para luego tener 1:96 el día 70 y terminar la prueba con la dilución 1:128 el día 84. En el caso del grupo de peces no vacunados al inicio de la prueba presentó la dilución 1:16, luego 1:32 el día 14, 1:16 el día 28, 1:8 el día 42, oscilando entre 1:16 y 1:32 durante el tiempo restante del experimento.

6. DISCUSIÓN.

La acuicultura durante los últimos años ha ganado un importante espacio en la economía nacional, transformando a los productos de la salmonicultura en un recurso renovable de gran relevancia para el país. Los tratados internacionales suscritos por Chile, hacen crecer el mercado consumidor y así las condiciones para hacer la producción competitiva ante productos alternativos. Las exigencias internacionales apuntan hacia la calidad de los productos y de su proceso productivo, siendo el concepto sanitario el más importante. Dentro de este concepto, la prevención de enfermedades es la estrategia sanitaria más eficiente y la vacunación la alternativa de mayor eficacia. En la presente investigación se evalúa una vacuna contra el virus IPN como herramienta para la prevención de ésta enfermedad.

Durante el estudio se utilizaron peces de la especie *Salmo salar* provenientes de una piscicultura de la Décima Región, sin antecedentes previos de cuadro clínico de la enfermedad y de vacunación contra IPN. Durante el período de aclimatación los peces se presentaron clínicamente sanos, condición confirmada a través de un chequeo sanitario realizado previamente a 30 peces tomados al azar, tamaño muestral utilizado en otros estudios de similares características (Müller, 2001; San Martín, 2001; Mansilla, 2002; Cristi, 2003). El cambio de conducta presentado por los peces durante el período previo a la vacunación se explica por el estrés del traslado y cambio de ambiente, como describe Taksdal y col. (1998).

Inmediatamente posterior a la vacunación los peces se observaron letárgicos debido a la anestesia con BZ-20[®] recuperándose rápidamente. La benzocaína, principio activo de BZ-20[®], posee la propiedad, independiente del tiempo de anestesia, de recuperar a los individuos en forma rápida y no producir impacto sobre el consumo de alimento (Sorum y Damsgard, 2003).

Las muestras tomadas para el análisis de las mortalidades correspondieron, de acuerdo al tamaño de los peces, a riñón anterior y bazo como recomienda Winton (1992). Para el aislamiento del virus, se procedió a sembrar el sobrenadante centrifugado del macerado de órganos en una monocapa celular de CHSE-214, células de elección para el diagnóstico de IPN (Havarstein y col., 1990; Frost y Ness, 1997; Cerna, 2000; Bowden y col., 2002; Munro y col., 2003; Rivera y col., 2003; Smail y col., 2003).

La vía de inoculación intraperitoneal, tanto para el producto experimental como para el virus, asegura el ingreso y la cantidad deseada del inóculo, y ha sido el método de elección en estudios previos (Stangeland y col., 1996; Frost y Ness, 1997; Taksdal y col., 1998; Müller, 2001; San Martín, 2001; Bowden y col., 2002; Mansilla, 2002; Cristi, 2003; Rivera y col., 2003). Sin embargo, esta vía provoca un quiebre artificial de las barreras naturales de defensa, condición irreproducible en la dinámica de la infección, ya que estimula sólo la respuesta inmune activa en los peces.

Los resultados obtenidos de porcentaje de mortalidad acumulada indican que la mayor mortalidad se registró en los grupos de peces no vacunados agua dulce y no vacunados agua salada con un 17,14% y un 18,18%, respectivamente. Los grupos vacunados registraron mortalidad acumulada en agua dulce de 2,85% y en agua salada de 5,88%. Los peces mantenidos en agua salada mostraron mayor mortalidad que sus homólogos de agua dulce, lo cual se debe a la menor capacidad de osmorregulación en peces de este tamaño.

El inicio de la mortalidad post desafío se produjo entre el día 10 p.i. y el día 19 p.i., correspondiendo al grupo de peces no vacunados agua salada. Registros de desafíos intraperitoneales indican mortalidades a partir del día 3 p.i. (Stangeland y col., 1996; Cristi, 2003) y el día 7 p.i. (Bowden y col., 2002). Stangeland y col. (1996), indica que las mortalidades tempranas se deben al estrés osmótico provocado por el virus que interfiere en la osmorregulación de los individuos. Si bien el grupo de peces que inició el registro de mortalidades coincide con lo reportado por Cristi (2003), el día de inicio de la mortalidad se asemeja a los registros de Ramstad y Midtlyng (2003), quienes lograron mortalidades específicas de IPN entre el día 10 p.i. y 12 p.i. en peces desafiados por inmersión. Los grupos de peces vacunados de agua dulce y vacunados de agua salada registraron mortalidades más tarde, lo que indicaría la producción de respuesta inmune provocada por la vacuna en estudio. Las mayores mortalidades registradas corresponden a los grupos no vacunados agua dulce y no vacunados agua salada con pico de mortalidad posterior al día 50 post desafío. Los resultados de los experimentos están influenciados por la interacción de factores de los peces (especie, cepa, edad, estado de madurez, tolerancia inmunológica), del agente infeccioso (serotipo, cepa, grado de atenuación durante el cultivo celular, concentración), el método de infección (baño, inyección, cohabitación) y el medio ambiente (temperatura, calidad del agua, alimentación y manejos) (Taksdal, 1999).

El estudio realizado por Frost y Ness (1997) reporta que las vacunas contra IPN inoculadas a presmolts disminuyen su protección en la etapa siguiente, presentando los peces un bajo nivel de anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo y reducida capacidad de provocar la respuesta inmune, siendo influenciados por el estrés provocado por el traslado al mar (Evans, 1993). Sin embargo, estudios recientes indican que peces analizados 6 meses posteriores al traslado al mar fueron capaces de montar una respuesta inmune contra IPN (Erdal y col., 2003). La utilización de peces postmolts en investigaciones realizadas por Stangeland y col. (1996), Taksdal y col. (1998) y Bowden y col. (2002) demuestran la importancia de la inmunocompetencia en esta etapa del ciclo. En esta investigación se reprodujo experimentalmente la infección por el virus IPN en Salmón del Atlántico presmolt, al igual que estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile (Müller, 2001; San Martín, 2001; Mansilla, 2002; Cristi, 2003).

El estudio se realizó con dosis constantes del virus y dosis constantes de la vacuna a partir del modelo descrito por Amend (1981). El título viral inoculado correspondió a $1,5 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀/pez cumpliendo con la dosis mínima de infección 10^5 TCID₅₀/pez que se reporta por Bowden y col. (2002) y Rivera y col. (2003), pero siendo bajo comparado con el título inoculado por Mansilla (2002) que inoculó $10^{6,16}$ TCID₅₀/pez, logrando desarrollar la enfermedad con la presentación de mortalidades tempranas.

Los signos clínicos observados en los peces durante el experimento fueron poco manifiestos, similares a los descritos por Taksdal (1999) que propone que en condiciones naturales el curso de IPN es agudo, por lo que la signología clínica es manifiesta, lo que no ocurre en situaciones experimentales. Sin embargo, peces que presentaron el cuadro clínico de la enfermedad desarrollaron lesiones internas específicas de IPN descritas por Roberts (1989), Post (1983), Wolf (1988), Quaglio (1989), Stoskopf (1993) y Plumb (1999). La signología poco manifiesta en este experimento se debería al título viral utilizado, que si bien es superior al mínimo descrito por Bowden y col. (2002) y Rivera y col. (2003), sería insuficiente dado el tamaño de los peces.

Para la evaluación de una vacuna experimental, existen criterios objetivos descritos por Nordmo (1997), mediante los cuales se clasifica una vacuna en 3 categorías:

- $RPS < 70$ = Vacunación deficiente.
- $RPS > 70$ = Vacunación suficiente.
- $RPS > 80$ = Vacunación exitosa.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este experimento, el producto puede catalogarse como “exitoso” en el caso de ser aplicado en agua dulce (83,4%) y como “deficiente” en el caso de aplicaciones en agua salada (67,66%).

Los resultados son dependientes de los factores que interactúen durante el experimento y son exclusivos a los diferentes modelos utilizados. En estudios similares (San Martín, 2001; Mansilla, 2002; Cristi, 2003), se han obtenido diferentes resultados de RPS con distintos productos y en diferentes ambientes, dificultándose la comparación entre ellos. Así, la estandarización de un modelo experimental que permita comparar diferentes resultados aparece como un gran desafío, dada la gran cantidad de factores relacionados (Taksdal, 1999).

Los permisos de comercialización y registro de vacunas son responsabilidad del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), que considera como satisfactoria una prueba de vacunación en salmonídeos, cuando la mortalidad acumulada (%) del grupo control es $> 60\%$ y el RPS del grupo vacunado es $> 75\%$. De acuerdo a esto, la vacuna en estudio entrega un nivel de mortalidades poco exigente, pues, en ambos grupos controles (no vacunados agua dulce y no vacunados agua salada) el nivel de mortalidad no supera el 20%.

Se necesita mayor información para definir la calidad y las aplicaciones de la vacuna, siendo importante la prueba de seroneutralización en agua dulce y agua salada. Los resultados obtenidos en esta prueba, indican que a partir del día 14 se observaron diferencias entre las muestras de los grupos experimentales manifestándose en hasta tres diluciones (día 14, 28 y 70) entre muestra de peces vacunados versus peces no vacunados (1:128 v/s 1:16). Así mismo, indica que existe relación entre la disminución del título de anticuerpos (día 28 al día 70) y el inicio de la mortalidad en el grupo de peces vacunados. Sin embargo, los títulos neutralizantes encontrados fueron bajos comparados con el trabajo de Müller (2001), cuya dilución mayor alcanzó 1: 512 el día 42 post vacunación. Algunos manejos como congelar y descongelar el suero pueden provocar pérdidas en la función neutralizante por una disminución en el título de

anticuerpos y en la capacidad de mantener la funcionalidad en el tiempo (Müller, 2001). Existen características determinantes en los anticuerpos de los peces que explican la labilidad de IgM: tienen una baja afinidad intrínseca (afinidad del sitio de unión), poseen una baja capacidad de aumentar con el tiempo en afinidad después de la inmunización (maduración de afinidad) (Everlyn, 1996). Los resultados obtenidos coinciden en la caída del título de anticuerpos el día 56 con el trabajo de Müller (2001), recomendándose en este caso la aplicación de un booster de 0,1 ml a los 50 días postvacunación para aumentar los títulos que disminuyen el día 56.

El análisis de los peces sobrevivientes al final del experimento comprendió necropsia individual a cada individuo sobreviviente, realizando la toma de muestras de riñón y bazo en forma colectiva según lo estipulado por Winton (1992). La técnica diagnóstica correspondió a cultivo celular, confirmando el diagnóstico a través de IFAT-IPN, test de Inmunofluorescencia indirecta, utilizado exitosamente por Swanson (1981); San Martín (2001), Cristi (2003), Rivera y col. (2003) y Smail y col. (2003). Los resultados indicaron que el 100% de los “pools” de peces analizados de los grupos vacunados presentaron CPE. Al analizar estos resultados, se observa que ambos grupos de peces vacunados estarían presentando la condición de portadores del virus. Los grupos no vacunados presentaron CPE en menor medida 25/29 en agua dulce y 4/27 en agua salada correspondientes a 86% y 14%, respectivamente, mostrando cierta resistencia a la infección que se podría explicar por la presentación de defensa antiviral, mecanismo que desencadena la producción de interferón (IFN) estimulado por la propia infección viral (Roberts, 1989; Larsen y col., 2003; Robertsen y col., 2003).

La importancia epidemiológica de los peces portadores, radica en que los individuos al presentar esta condición, se transforman en diseminadores del agente. Por otro lado, la ausencia de signología clínica impide la identificación y eliminación de estos individuos, manteniendo latente la posibilidad de infección tanto en la naturaleza como en cultivos intensivos (Reno, 2000). Los peces silvestres se indican como vectores del virus IPN, sin embargo, los resultados del trabajo realizado por Wallace y col. (2003) muestran una baja prevalencia de IPN en los peces silvestres, por lo tanto los peces de cultivo estarían actuando como vectores y reservorio del virus. El estudio realizado por Cerna (2000) indica alta prevalencia de portadores del virus IPN en peces reproductores, siendo mayor en el caso de los reproductores machos, resultado relevante dado la multiplicación del producto gonadal.

Para tener seguridad de la calidad de una vacuna para peces, el producto a utilizar debe cumplir ciertos requisitos, como son: producir una respuesta inmune efectiva, producir protección a varios serotipos relevantes, prevenir la presentación de portadores, ser inocua, ser de fácil administración y tener bajo costo de producción (Christie, 1997; Leong y Fryer, 1993). El ingreso al mercado de una vacuna experimental, debe ser evaluado a partir de la calidad del producto, evaluación realizada por pruebas de laboratorio complementarias, tales como: la Prueba de potencia, la Prueba de seroneutralización (ambas realizadas en este estudio) y la Prueba de seguridad (evalúa daños orgánicos atribuibles a la vacunación) (Müller, 2001; Mansilla, 2002; Leal, 2003).

CONCLUSIONES.

- El producto se cataloga como exitoso en el caso de agua dulce a partir de los resultados de RPS (83,4%), aunque la evaluación fue poco exigente, no existiendo información de la respuesta inmunológica en este tipo de agua en la prueba de seroneutralización.
- Los peces desarrollan respuesta inmunológica en agua salada, pero su RPS (67,66%) entrega una evaluación deficiente para el producto.
- Se acepta la hipótesis planteada, obteniendo con la inoculación de la vacuna, altos títulos de anticuerpos neutralizantes para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en *Salmo salar*.

7. BIBLIOGRAFÍA.

AHNE, W., R.K. KELLY, H.J. SCHLOTFELDT. 1989. Factors affecting the transmission and outbreak of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN). Abstracts book. Fish health protection strategies. Hamburg/Bonn. pp: 19- 67.

AMEND, D. 1981. Potency testing of fish vaccines. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, USA. *Develop. biol. Standard* 49: 447 – 454.

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.

CÁRCAMO, E. 2002. Comparación entre los serotipos Sp, Ab, VR299 y aislados nacionales del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) de salmonídeos. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

CARVAJAL, P. 2000. Industria, vacunas para la salmonicultura. *Salmonoticias* 83: 11-15.

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.

CHRISTIE, K.E. 1997. Immunization with Viral Antigens: Infectious Pancreatic Necrosis. *Fish Vaccinology* 90: 191-199.

CRISTI, M. 2003. Evaluación de la eficacia de dos vacunas experimentales bivalentes para el control de Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Memoria de título, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

DORSON, M. 1981. Role and characterization of fish antibody. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, USA. *Develop. biol. Standard* 49: 307 – 319.

ERDAL, J.I., B. SKJELSTAD, K.B. SOLEIM. 2003. Evaluation of protection from vaccination against Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in a GCP field trial en Norway. Abstracts Book. 11th International Conference of the EAAP, Saint Julians, Malta.

EVANS, D.H. 1993. The physiology of fishes. CRC Marine science series. United States of America.

EVERLYN, T.P. 1996.. In the Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. *Infection and diseases* pp: 339-362. Ed. by G. Iwana and T. Nakanishi. San Diego: Academic Press, USA.

FROST, P., A. NESS. 1997. Vaccination of Atlantic salmon with recombinant VP2 of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), added to a multivalent vaccine, suppresses viral replication following IPNV challenge. *Fish and Shellfish Immunol.* 7: 609-619

HAVARSTEIN, L.S., C. ENDRESEN, B. HJELTNES, K.E. CHRISTIE, J. GLETTE. 1990. Specific immunoglobulins in serum from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., immunized with *Vibrio salmonicida* and infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 13: 101-111.

LARSEN, R., T.P. ROKENES, B. ROBERTSEN. 2003. Inhibition of Infectious Pancreatic Necrosis virus (IPNV) by the Atlantic salmon Mx1 protein. Abstracts Book. 11th International Conference of the EAAP, Saint Julians, Malta.

LEAL, J. 2003. 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, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

LEONG, J.C., J.L. FRYER. 1993. Viral vaccines for aquaculture. *Annual Rev. of Fish Diseases* 3: 225-240.

MANSILLA, A. 2002. Estudio de seguridad y potencia de una vacuna inyectable para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmones del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

McALLISTER, P., W. OWWENS, T. RUPPENTHAL. 1987. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in polluted cell and particulate components from varian fluid of brook trout (*Salvenilus fontinalis*). *Dis. Aquat. Org.* 2: 235-237.

McALLISTER, P.E., J. BEBAK. 1997. Infectious pancreatic necrosis virus in the environment relationship to effluent from aquaculture facilities. *J. Fish Dis.* 20: 201 – 207

MENDEZ, R. 1998. La acuicultura en Chile. *Aquanoticias Internacional* 45: 12-21.

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.

MUNRO, E.S., R. KERR, A.F. ZUUR, T.S. HASTINGS. 2003. An analysis of levels of Infectious Pancreatic Necrosis virus in Atlantic salmon broodstock in Scotland between 1990 – 2001. Abstracts Book. 11th International Conference of the EAAP, Saint Julians, Malta.

NORDMO, R. 1997. Strengths and Weaknesses of Different Challenge Methods. *Fish Vaccinology*. Gudding, R., Lillehoug, A., Midtlyng, P. J., Brown, F.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE). 2000. Diagnostic Manual for Aquatic animal diseases. 3rd Edition. Ed. by the O.I.E. fish diseases dominion. Paris, Francia.

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

POST, G. 1983. Textbook of fish health. Ed. by TFH Publications, Inc. Ltd, USA..

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

RAMSTAD, A., P.J. MIDTLYNG. 2003. Validation of a bath challenge model for IPN vaccines in Atlantic salmon. Abstracts Book. 11th International Conference of the EAFP, Saint Julians, Malta.

REED, L.H., MUENCH. 1938. A simple method for estimating fifty percents endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.

RENO, P. 2000. Infectious pancreatic necrosis virus.
http://www.hmsc.orst.edu/classes/MB492/IPNVbouska/IPNV_home.html

RIVERA, A., M. MONRÁS, R. ENRÍQUEZ. 2003. Pathogenicity of two Chilean IPN isolates and VR-299 strain of the virus in Atlantic salmon (*S. salar*) and Rainbow trout (*O. mykiss*). Abstracts Book. 11th International Conference of the EAFP, Saint Julians, Malta.

ROBERTS, R. J. 1989. Fish pathology. Ed. by Ballière Tindall, London, Inglaterra.

ROBERTSEN, B., V. JENSEN, T. ROKENES, R. LARSEN, A. ALBUQUERQUE. 2003. Molecular and functional properties of Atlantic salmon interferon. Abstracts Book. 11th International Conference of the EAFP, Saint Julians, Malta.

SAN MARTÍN, C. 2001. Evaluación de una vacuna comercial para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

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

SMAIL, D.A., N. BAIN, D.W. BRUNO, W. MACDONALD, S.J. MORRICE, D.J. PENDREY, C.O. CUNNINGHAM. 2003. An epizootic of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in the Shetland isles: virus identification, histopathology and genetic characterization of the isolate. Abstracts Book. 11th International Conference of the EAFP, Saint Julians, Malta.

SMITH, P., J. LARENAS, P. VERA, J. CONTRERAS, C. VENEGAS, M.E. ROJAS, A. GUAJARDO. 2002. Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. *Monografías med. vet.* 21: 3-19.

SORUM, U., B. DAMSGARD. 2003. Effects of anaesthetization and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Abstracts Book. 11th International Conference of the EAFP, Saint Julians, Malta.

STANGELAND, K., S. HOIE, T. TAKSDAL. 1996. Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts. *J. Fish Dis.* 19: 323-327.

STOSKOPF, M.K. 1993. Fish medicine. Ed. by W. B. Saunders, Philadelphia, USA.

SWANSON, R.N. 1981. Use of the indirect fluorescent antibody test to study the pathogenesis of Infectious Pancreatic Necrosis Virus infection in trout. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, USA. *Develop. biol. Standard* 49: 71 – 77

TAKSDAL, T., A. RAMSTAD, K. STANGELAND, B.H. DANNEVIG. 1998. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *J. Fish Dis.* 21: 193 – 204.

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

WALLACE, I.S., R.S. RAYNARD, A. GREGORY, A.G. MURRAY, K. ADAMSON, A.I. M. MACDONALD, A.L. WARWICK, D.A. SMAIL, J.H. WEBB. 2003. Investigation into the prevalence of Infectious Pancreatic Necrosis in wild fish from Scotland. Abstracts Book. 11th International Conference of the EAFP, Saint Julians, Malta.

WINTON, J.R. 1992. Fish health blue book. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish health section. *American Fisheries Society* pp: 13 – 21

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

ANEXO N°1.

Mediciones de algunos parámetros del agua, realizados durante el período post vacunación, en los acuarios de agua dulce.

SEMANAS VACUNACIÓN	ACUARIOS	O₂ (>8 mg/l)	DBO₅ (mg/l)	pH (> 5,5 y < 8)
1ª Semana	Vacunados	9,9	1,9	6,1
	No vacunados	10,0	1,8	6,0
2ª Semana	Vacunados	9,9	2,1	5,9
	No vacunados	9,8	2,3	5,8
3ª Semana	Vacunados	10,0	1,6	6,0
	No vacunados	9,9	1,9	6,0
4ª Semana	Vacunados	9,9	1,4	6,1
	No vacunados	9,8	1,9	6,1
5ª Semana	Vacunados	10,1	1,6	5,9
	No vacunados	9,8	1,8	6,0
6ª Semana	Vacunados	9,7	2,0	5,8
	No vacunados	9,5	1,6	6,0
7ª Semana	Vacunados	9,6	2,1	6,0
	No vacunados	9,1	2,2	6,1
8ª Semana	Vacunados	9,5	1,8	5,9
	No vacunados	9,3	1,9	6,1
9ª Semana	Vacunados	9,4	2,1	6,1
	No vacunados	9,6	2,1	5,9
10ª Semana	Vacunados	9,3	1,8	6,0
	No vacunados	9,6	1,8	6,1

- Las muestras para realizar las mediciones de agua, se tomaron una de cada grupo (vacunado y no vacunado) al azar.
- Valores y unidades entre paréntesis, corresponden a valores de referencia y a unidades de medida de los diferentes parámetros.

ANEXO N°2.

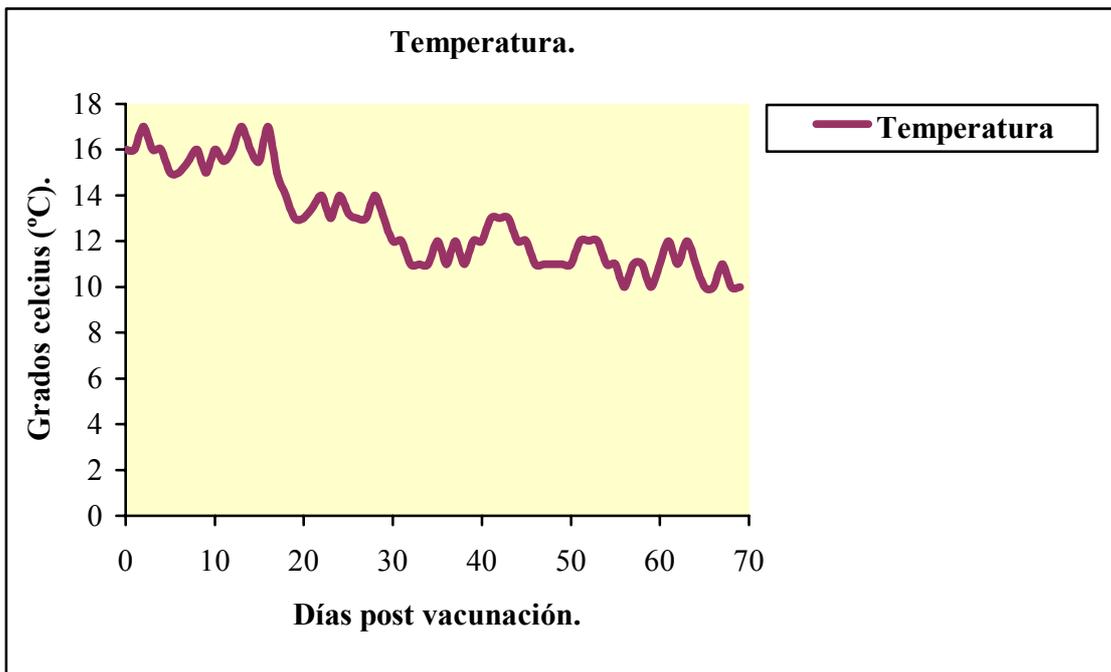
Mediciones de algunos parámetros del agua, realizados durante el período post vacunación, en los acuarios de agua salada.

SEMANAS VACUNACIÓN	ACUARIOS	O₂ (>8 mg/l)	DBO₅ (mg/l)	pH (> 5,5 y < 8)
1ª Semana	Vacunados	9,7	1,8	6,3
	No vacunados	9,8	1,6	6,5
2ª Semana	Vacunados	9,7	1,9	6,3
	No vacunados	9,6	1,7	6,4
3ª Semana	Vacunados	9,7	1,4	6,5
	No vacunados	9,6	1,8	6,6
4ª Semana	Vacunados	9,8	1,3	6,4
	No vacunados	9,7	1,5	6,2
5ª Semana	Vacunados	9,9	1,4	6,3
	No vacunados	9,8	1,7	6,1
6ª Semana	Vacunados	9,5	2,1	6,0
	No vacunados	9,5	1,7	6,4
7ª Semana	Vacunados	9,4	2,0	6,3
	No vacunados	9,1	2,1	6,4
8ª Semana	Vacunados	9,3	1,6	6,4
	No vacunados	9,1	1,5	6,3
9ª Semana	Vacunados	9,0	2,0	6,3
	No vacunados	8,9	1,9	6,4
10ª Semana	Vacunados	8,8	1,6	6,5
	No vacunados	8,7	1,5	6,3

- Las muestras para realizar las mediciones de agua, se tomaron una de cada grupo (vacunado y no vacunado) al azar.
- Valores y unidades entre paréntesis, corresponden a valores de referencia y a unidades de medida de los diferentes parámetros.

ANEXO N°3.

Gráfica de la temperatura diaria registrada durante el período post vacunación, en los acuarios utilizados para el desafío con IPNV.

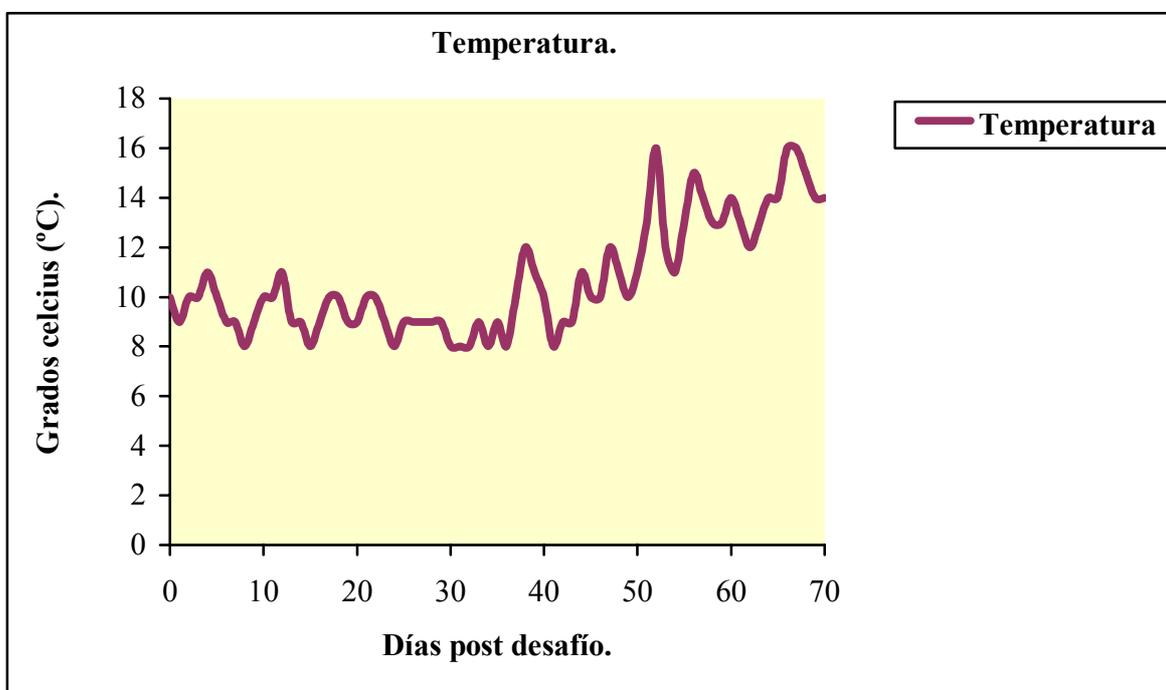


ANEXO N°4.

Registro de mortalidades durante el post desafío en la prueba de potencia, de los acuarios duplicados de los grupos experimentales vacunados y no vacunados.

Días Desafío	Vacunados.				No vacunados.			
	Agua dulce		Agua salada		Agua dulce		Agua salada	
	D/A	%	D/A	%	D/A	%	D/A	%
0 al 9	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0
10 al 19	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0	0/0	0,0
20 al 29	0/0	0,0	1/1	2,94	0/0	0,0	0/0	0,0
30 al 39	1/1	2,85	1/2	5,88	0/0	0,0	4/4	12,12
40 al 49	0/1	2,85	0/2	5,88	1/1	2,85	0/4	12,12
50 al 59	0/1	2,85	1/3	8,82	0/1	2,85	2/6	18,18
60 al 69	0/1	2,85	0/3	8,82	4/5	14,28	0/6	18,18
Total	1	2,85	3	8,82	5	14,28	6	18,18

Grafica que corresponde a las temperaturas diarias registradas durante el post desafío en la prueba de potencia realizada a los grupos experimentales.



ANEXO N°5.

Mediciones de algunos parámetros del agua, realizados durante el período post desafío, en los acuarios de agua dulce.

SEMANAS VACUNACIÓN	ACUARIOS	O₂ (>8 mg/l)	DBO₅ (mg/l)	pH (> 5,5 y < 8)
1ª Semana	Vacunados	9,5	1,5	6,0
	No vacunados	9,6	1,7	5,9
2ª Semana	Vacunados	9,5	2,0	5,8
	No vacunados	9,5	2,1	5,8
3ª Semana	Vacunados	9,6	1,4	5,9
	No vacunados	9,6	1,7	6,0
4ª Semana	Vacunados	9,4	1,6	6,2
	No vacunados	9,3	1,5	6,2
5ª Semana	Vacunados	9,3	1,6	5,8
	No vacunados	9,1	1,5	6,0
6ª Semana	Vacunados	9,2	2,1	5,9
	No vacunados	9,0	1,8	6,1
7ª Semana	Vacunados	9,0	2,2	6,1
	No vacunados	8,9	2,0	6,1
8ª Semana	Vacunados	8,8	1,5	5,8
	No vacunados	8,9	1,7	6,0
9ª Semana	Vacunados	9,0	2,1	6,1
	No vacunados	9,1	1,9	5,8
10ª Semana	Vacunados	8,7	1,6	5,9
	No vacunados	8,8	1,5	6,1

- Las muestras para realizar las mediciones de agua, se tomaron una de cada grupo (vacunado y no vacunado) al azar.
- Valores y unidades entre paréntesis, corresponden a valores de referencia y a unidades de medida de los diferentes parámetros.

ANEXO N°6.

Mediciones de algunos parámetros del agua, realizados durante el período post desafío, en los acuarios de agua salada.

SEMANAS VACUNACIÓN	ACUARIOS	O₂ (>8 mg/l)	DBO₅ (mg/l)	pH (> 5,5 y < 8)
1ª Semana	Vacunados	8,7	1,6	6,4
	No vacunados	8,8	1,5	6,3
2ª Semana	Vacunados	8,7	1,7	6,4
	No vacunados	8,6	1,9	6,4
3ª Semana	Vacunados	8,7	1,6	6,5
	No vacunados	9,0	1,6	6,3
4ª Semana	Vacunados	9,0	1,5	6,4
	No vacunados	9,1	1,7	6,1
5ª Semana	Vacunados	8,8	1,8	6,3
	No vacunados	8,8	1,8	6,1
6ª Semana	Vacunados	8,5	2,2	6,2
	No vacunados	8,6	1,9	6,2
7ª Semana	Vacunados	8,5	2,2	6,3
	No vacunados	8,6	2,1	6,4
8ª Semana	Vacunados	9,0	1,4	6,2
	No vacunados	9,1	1,7	6,3
9ª Semana	Vacunados	8,9	2,1	6,4
	No vacunados	8,7	1,8	6,3
10ª Semana	Vacunados	8,6	1,4	6,4
	No vacunados	8,5	1,5	6,2

- Las muestras para realizar las mediciones de agua, se tomaron una de cada grupo (vacunado y no vacunado) al azar.
- Valores y unidades entre paréntesis, corresponden a valores de referencia y a unidades de medida de los diferentes parámetros.

ANEXO N°7.

TÉCNICA IFAT – IPN.

- La técnica utiliza anticuerpos monoclonales que son específicos para el virus IPN, tanto del serotipo Sp como VR-299.
- Los anticuerpos reaccionan con las proteínas VP2 y VP3 del agente. Después de una etapa de lavado para remover el anticuerpo libre, la presencia del virus se detecta por la reacción de un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y posterior observación en un microscopio de fluorescencia.
- Reactivos: Reactivo oligoclonal
Conjugado - FITC
Solución de lavado
Solución de dilución

PROCEDIMIENTO.

- Agregar sobre cada frotis 100 µl del reactivo oligoclonal previamente diluido 1:200 con la solución de dilución e incubar los portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada. Evitar que se seque la solución del anticuerpo.
- Para lavar, trasladar los portaobjetos a un recipiente adecuado el cual debe contener abundante solución de lavado previamente diluida 1:25 y dejarlos reposar por 3 a 5 minutos. Repetir este procedimiento tres veces más. Remover los portaobjetos del recipiente y eliminar el exceso de solución evitando que el tejido se seque.
- Agregar sobre cada frotis 100µL del conjugado-FITC, previamente diluido 1:100 con la solución de dilución. Incubar los portaobjetos a temperatura ambiente por 30 minutos en una cámara húmeda cerrada y en oscuridad.
- Repetir el procedimiento de lavado descrito en el segundo paso.
- Poner 10 a 20 µL de solución de montaje, cubrir la muestra con un cubreobjeto evitando la formación de burbujas, y tomar precaución de sellar el cubreobjeto con algún adhesivo disponible.
- Las muestras se deben examinar en un microscopio de fluorescencia con un aumento de 1000X e inmersión para realizar el diagnóstico.
- Se realiza la observación en un microscopio de epifluorescencia. Las muestras positivas a IPN presentan una coloración verde fluorescente en el citoplasma correspondiente al virus.

AGRADECIMIENTOS.

- Debo al esfuerzo de mis padres, Alicia y Cheo, lo que estoy viviendo en este momento, y es el desarrollo de esta memoria, el instrumento que hará trascender su incondicional apoyo y permanente dedicación. Basados en el profundo sentimiento de amor a sus hijos, me entregaron este hermoso regalo que se los agradeceré por siempre. Mamá y Papá, ya salió el primero, lo lograron.
- Mis hermanos, Jorge y Javier, fundamentales a la hora de preguntar la evolución del trabajo. Gracias por su apoyo y dedicación.
- Especial agradecimiento a Marisol, por acompañarme en estos momentos tan importantes de mi vida, nunca lo olvidaré. Ahora comienza otra etapa ...
- A mis amigos, por su compañía y apoyo sobre todo durante el período experimental del trabajo: Mauricio, Alex, Miguel Ángel, muchas gracias.