

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

**EVALUACIÓN DE LA POTENCIA DE DOS VACUNAS EXPERIMENTALES PARA  
LA PREVENCIÓN Y CONTROL 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.**

**FREDDY WILSON RUBILAR MARTINEZ**  
**VALDIVIA – CHILE**

**2004**

**CONTRAPORTADA**

**PROFESOR PATROCINANTE**

**Dr. Ricardo Enríquez S.** \_\_\_\_\_

**Firma**

**COLABORADOR**

**Sra. Mónica Monrás S.** \_\_\_\_\_

**Firma**

**PROFESORES CALIFICADORES**

**Dr. Carlos Farías R.** \_\_\_\_\_

**Firma**

**Dr. Patricio Esquivel S.** \_\_\_\_\_

**Firma**

**FECHA DE APROBACIÓN: 02 de Julio del 2004.**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>26</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>30</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>35</b>

## 1. RESUMEN

### **“Evaluación de la potencia de dos vacunas experimentales para la prevención y control de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*).”**

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta principalmente a los salmónidos jóvenes. Sin embargo, en salmón del Atlántico los brotes se producen durante el periodo de agua dulce y en los primeros tres a cuatro meses posteriores a la transferencia de los smolt al mar, con mortalidad asociada de 30-40 % durante el primer mes.

Con el objeto de prevenir la presentación de esta enfermedad en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) post transferencia al mar, se evaluaron dos vacunas experimentales para IPN en salmón del Atlántico. Para la realización del experimento los peces se dividieron en tres grupos, permaneciendo en estanques de 500 l. de agua (85 peces cada uno) durante el periodo de acondicionamiento y vacunación. Durante el periodo de acondicionamiento se realizó el chequeo sanitario a 30 peces tomados al azar. Posteriormente se realizó la vacunación intraperitoneal con los productos experimentales C y D en dosis de 0,2 ml, por pez y solución fisiológica al 0,85% NaCl en igual dosis al grupo no vacunado. Luego de transcurridos como mínimo 500° día, por recomendación del fabricante de las vacunas, se trasladaron los peces de cada estanque a la sala de acuarios para efectuar la siguiente etapa del experimento, que consistía en el desafío con IPNV serotipo Sp en dosis  $10^{5,6}$  TICD<sub>50</sub> / 0,2 ml / pez. El desafío de los peces se realizó vía intraperitoneal en agua de mar al 26‰ de salinidad. Se distribuyeron en 6 acuarios 35 peces cada uno, 2 acuarios (duplicados) para cada producto (C y D) y no vacunados. Se registró la mortalidad diaria y se efectuaron cultivos celulares, titulación por gramo de órgano e IFAT-IPNV para comprobar la mortalidad por el agente en estudio. Una vez terminados los 45 días de desafío se realizó el sacrificio de los peces sobrevivientes para determinar el estado portador de IPN. Además durante la etapa de vacunación y desafío se registró la temperatura diaria y algunos parámetros del agua.

En la prueba de potencia se evaluaron las vacunas a través del RPS (Porcentaje Relativo de Supervivencia). En los peces desafiados con IPNV se obtuvo un RPS de 70,5% en los peces vacunados con la vacuna experimental C y un 82% para los vacunados con D. Sin embargo, el nivel de mortalidad obtenido en el grupo no vacunado no fue suficiente para validar este RPS. En el análisis de los sobrevivientes no se detectaron portadores en los grupos vacunados y se registró un 18,8% en el grupo no vacunado.

**Palabras clave: Vacunas, IPN, salmón Atlántico.**

## 2. SUMMARY

### **“Evaluation of the potency of two experimental vaccines for the prevention and control of the Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)”.**

Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) is a highly contagious viral disease that mainly affects the young salmonids. However, in Atlantic Salmon the outbreaks take place during the period of fresh water and in the first three to four months after of the transference of smolt to the sea, with associated mortality of 30-40% during the first month.

With the purpose of preventing this disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post transference to the sea, two experimental vaccines for IPN were evaluated in Atlantic salmon. For carrying out this experiment the fishes were divided into three groups, in tanks of 500 l. of water (85 fish each one) during the period of acclimatization and vaccination. During the period of acclimatisation, a health status were chequed to 30 fishes taken at random. Afterwards, an intraperitoneal vaccination was carried out with the experimental products C and D in dose of 0,2 ml, fish and physiological solution to 0,85 % NaCl same dose to the non-vaccinated group. After a minimum of 500° day, as a recommendation of the vaccine's producer, the fish of each tank were moved to the aquaria to carry out the following step of the experiment that consisted in the challenge with IPNV serotipo Sp in dose of  $10^{5,6}$  TICD<sub>50</sub> / 0,2 ml / fish. The challenge of the fish was carried out via intraperitoneal in sea water to 26‰ salinity. Fishes were distributed in 6 aquariums containing 35 fishes each., 2 aquarium (duplicated) for each product (C and D) and a non- vaccinated group. The daily mortality was registered and cellular cultures were done, titled by gram of organ and IFAT-IPNV to check the mortality by the agent in study. After 45 days of challenge, the survivor fishes were killed in order to determine the carrying state of IPN. Beside, during the stage of vaccination and challenge, daily temperature and some other parameters were recorded.

In the potency test, the vaccines were evaluated by means of the RPS (Relative Percentage of Survival). Fish challenged with IPNV showed a RPS of 70,5 % when vaccinated with the experimental product C and a 82% for the vaccinated with product D. However, the mortality level obtained in the non-vaccinated group was not enough to validate this RPS. In the analysis of the survivor, no carriers were detected in the vaccinated and a 18,8% in the non vaccinated group carriers fishes were found.

**Key Words: Vaccines, IPN, Atlantic salmon.**

### 3. INTRODUCCIÓN

La industria salmonera chilena ha logrado un enorme crecimiento en apenas unas décadas. De registrar exportaciones mínimas en 1980, Chile ha llegado a ser el segundo país productor del mundo después de Noruega (Lozano, 2000). Este crecimiento ha obligado al desarrollo de un complejo sistema de producción, el que incluye no sólo la parte operativa, sino también la búsqueda científica de nuevas vacunas y sistemas de diagnóstico, a fin de garantizar la salud de los peces, que deben enfrentar cada cierto tiempo el desafío de nuevas enfermedades o el brote de las ya conocidas (Bioplanet, 2000).

Cifras del Banco Mundial indicaron que el año 1998, las pérdidas a consecuencia de las distintas patologías para la acuicultura a nivel global, fueron de tres mil millones de dólares al año (Carvajal, 2000). La salmonicultura chilena, no está ajena al efecto que tienen las enfermedades sobre esta actividad (Bravo, 2000). Se estima que las pérdidas de la industria nacional provocadas por enfermedades, ascienden a US \$ 150 millones anuales, considerando mortalidad, tratamientos y rendimientos no alcanzados, entre otros factores (Lozano, 2000).

Entre los diversos patógenos que elevan los costos del cultivo, tanto en agua dulce como de mar, los agentes virales son especialmente complejos, porque no existen terapias para tratarlos (Sano, 1995), lo que ha llevado en muchos países a situaciones extremas como son las de tener que destruir stocks, además de aplicar cuarentenas y estrictos programas de vigilancia como una manera de tener éxito en su control (Ruiz, 2001).

El impacto económico de las virosis se hace sentir principalmente en las condiciones de explotación intensiva. Las pérdidas afectan generalmente a sujetos 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 aumentan con el tiempo (De Kinkelin y col., 1991).

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es el último actor en el escenario acuícola, y tal vez uno de los mayores problemas de hoy en día (Bioplanet, 2000). Es un virus que fue reportado en el lago Llanquihue en 1984, identificándose como serotipo VR 299 (Carvajal, 2000), pero que no tuvo una connotación clínica o de mortalidad sino hasta hace unos años cuando irrumpió con más fuerza (Bustos y col., 1999).

En Chile, dado que se han importado ovas provenientes de Norteamérica y Europa y esta enfermedad se transmite verticalmente a través de las ovas, se encuentran presentes los dos serotipos más patógenos; VR299 y Sp, respectivamente (Bustos y col., 1999).

Los virus IPN, están distribuidos por todo el mundo, aislándose en Norteamérica (Canadá y Estados Unidos), en América del Sur (Chile), en la mayoría de los países de Europa del Este y el Oeste y en Asia (Japón, Korea, Taiwán y Tailandia) (McAllister, 1988).

En Chile el impacto en agua dulce ha sido relativamente bajo, pero en la zona estuarina y mar se han producido severos brotes que han alcanzado de un 30% a 40% de mortalidad en el primer mes (Bustos y col., 1999). La velocidad de diseminación ha sido acelerada; un ejemplo de ello es que en los primeros cinco meses de 1999, el Laboratorio de Fundación Chile logró el aislamiento en más de 55 oportunidades (Bustos y col., 1999).

La transmisión horizontal ocurre como una consecuencia de la diseminación del virus a través de heces, orina y productos sexuales de animales afectados (McAllister, 1988).

Algunos sobrevivientes a la infección se transforman en portadores del virus y son el reservorio de la infección en la generación contemporánea y subsiguiente (McAllister, 1988; Wolf, 1988). Además el virus puede ser transmitido en forma mecánica por una gran variedad de animales (McAllister, 1988).

La transmisión vertical del virus a la progenie es posible debido a que puede encontrarse asociado a la ova y espermio (Quaglio, 1989; Bustos y col., 1999).

Casos clínicos de la enfermedad se han presentado en las diferentes etapas de producción. En la etapa de alevinaje de S. del Atlántico pueden ocurrir mortalidades diarias de hasta un 10% y acumulada hasta un 90%. En piscicultura se han visto algunos casos asociados a manejos que desencadenan el brote (Lobos, 2000). En presmolt y smolt, IPN (sintomático) parece ocurrir solamente bajo exposición directa del virus acompañado por factores de estrés (aumento de temperatura, cambios fisiológicos como la esmoltificación, manejo y / o infección a causa de otros agentes) (Bustos y col., 1999). En peces recién trasladados al mar la mortalidad debido a IPNV ha variado hasta niveles de 30% o 40% acumulado en el periodo de seis meses post traslado (Lobos, 2000). Los brotes de enfermedad en peces de mayor edad implican portadores de virus que generalmente son activados por estrés (McAllister, 1988; Stoskopf, 1992).

Los signos clínicos de la enfermedad IPN pueden variar dependiendo de la cepa del virus, edad y condición fisiológica del huésped, así como también de acuerdo a las condiciones ambientales presentes tales como temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de cultivo (Roberts, 1989).

Dentro de los signos presentes se observan, distensión abdominal, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, natación errática con violentos movimientos rotatorios, branquias pálidas, hemorragias en zonas ventrales y bases de las aletas (Roberts, 1989). Internamente durante la infección con el virus de la IPN se pueden observar cambios patológicos de los tejidos pancreático, hepático y renal y también de la mucosa intestinal (McAllister, 1988).

El diagnóstico presuntivo puede basarse en los signos de la enfermedad, histopatología de los tejidos e historia de la patología en la población de peces. Sin embargo, para confirmar el diagnóstico, se requiere del aislamiento del virus en cultivos celulares y su identificación se basa en la reactividad serológica a través de neutralización, inmuno electroforesis, inmunofluorescencia (Stoskopf, 1992), pero existen otras opciones que se han desarrollado basadas en biología molecular, PCR y DOT- BLOT, estas prometen ser importantes herramientas diagnósticas de aplicación en terreno (Bustos y col., 1999).

Los órganos de elección para el diagnóstico virológico en peces portadores, son en orden de prioridad: riñón, páncreas, bazo e hígado. El fluido ovárico y seminal puede utilizarse en aquellos ejemplares no sacrificados (McAllister y col., 1987). El virus puede también ser recobrado del tejido cerebral (Stoskopf, 1992).

Las líneas celulares más comúnmente usadas para aislar el virus son BF-2, CHSE-214, PG y RTG-2. El virus replica bien entre 10 y 26 °C, pobremente a 4 °C y nada a 30 °C (Stoskopf, 1992).

La prevención y control de esta y otras enfermedades, es uno de los caminos que los productores deben afrontar para obtener los mejores rendimientos y posicionar a Chile como el productor número uno en el mundo. En los últimos años una serie de investigaciones se han realizado con el fin de encontrar nuevas formas de prevención de IPN, entre estas se encuentran la vacunación, medidas zoonitarias, elección de líneas genéticas resistentes (Bustos y col., 1999) y la búsqueda de compuestos con actividad antiviral, que hasta el momento han tenido resultados muy alentadores (Bioplanet, 2000).

La incidencia de IPN aguda y la consiguiente mortalidad puede ser reducida si se controlan los factores que promueven el estrés fisiológico y los que inducen la baja resistencia a la enfermedad (Stoskopf, 1992). Procedimientos tales como mantener los peces a baja densidad de población, protocolos óptimos de alimentación, máxima higiene de las instalaciones y utilización de tratamientos profilácticos de enfermedades bacterianas y parasitarias han sido efectivos para moderar los brotes de IPN (McAllister, 1988).

El virus es sensible a los desinfectantes yodados, pero estos pueden no ser efectivos para controlar la transmisión vertical de la enfermedad (Stoskopf, 1992). Para evitar completamente la introducción del virus IPN es esencial que las ovas con ojo y los reproductores provengan de existencias inspeccionadas y certificadas libres de IPN (Quaglio, 1989).

La primera enfermedad de salmones que se intentó controlar a través de la vacunación fue la Furunculosis en Estados Unidos en 1930 (Carvajal, 2000). Sin embargo, disminuyó el interés por la aplicación de las vacunas después del descubrimiento de los antibióticos. Hoy en día las vacunas volvieron a ganar terreno, convirtiéndose en el método más utilizado para el control de muchas enfermedades debido a que los agentes patógenos desarrollaron resistencia a los antibióticos (Palacios, 2001).



A partir de 1999 el primer producto vaccinal que comenzó a ser utilizado en centros de cultivo nacionales para el control de IPN fue una virina inyectable (Ruiz, 2001).

Actualmente se comercializan en Chile varias vacunas, entre ellas, una vacuna elaborada con tecnología ADN recombinante y contiene las proteínas recombinantes VP2 y VP3 del virus IPN (Ruiz, 2001).

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y el Servicio Nacional de Pesca, autorizaron el ingreso al país de vacunas contra esta patología. La decisión de los organismos gubernamentales de autorizar el ingreso de vacunas a territorio chileno radica en que establecieron que el IPN es una de las enfermedades presente en el país, que afecta a los salmónidos y está generando un impacto económico considerable para la industria salmonera (Palacios, 2001).

El proceso de registro y autorización de las vacunas ante el SAG, es bastante lento, debido a los exigentes requisitos impuestos por las autoridades. Esta situación ha obligado a que gran parte de las vacunas aún se encuentren en etapa experimental y de desarrollo, haciendo que la variedad disponible sea relativamente escasa (Palacios, 2001).

Las vacunas para peces funcionan en base a bacterias y virus inactivado que se inoculan en un individuo para que éste genere anticuerpos contra una cierta enfermedad, pero en los últimos años se han desarrollado las vacunas denominadas recombinantes y las de DNA (Carvajal, 2000).

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

Las vacunas recombinantes, desde un punto de vista biológico son mucho más seguras, ya que hay pleno control del proceso de producción antigénica (Carvajal, 2000).

El desarrollo de una vacuna de ADN se inicia ubicando los genes del patógeno que codifican para antígenos que tienen potencial de inducir inmunidad. Estos genes serán introducidos a una bacteria heterotrófica para su multiplicación. Posteriormente los genes son inyectados en pequeñas dosis a los peces donde, serán utilizados por las células del salmón para generar copias exactas a los antígenos del patógeno. Producidos estos antígenos, el sistema inmunológico del pez podrá sintetizar anticuerpos que le confieren resistencia frente al microorganismo agresor (Parada, 2001).

Existen tres métodos de vacunación en peces:

\_ Por inyección: Es la ruta más potente de vacunación, permite el uso de coadyuvante, es el método con mejor relación costo – beneficio en peces grandes y provoca estrés en peces de peso ligero.

\_ Por inmersión: Ideal para vacunar en forma masiva a peces de menos de 5 gramos, no ocasiona estrés, la potencia no es tan alta como en el caso de la inyección y dificulta la entrega de coadyuvante.

\_ Por administración oral: No es estresante, permite vacunar peces de cualquier tamaño y puede ser menos potente que los otros métodos.

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

- a) Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS).
- b) Aumento de la dosis letal 50.
- c) Aumento en el título de anticuerpos neutralizantes.

El Porcentaje Relativo de Supervivencia expresa el nivel de protección que puede otorgar una vacuna.

Las bases descritas por Ellis (1988) para utilizar el RPS son:

- a) Utilizar al menos 25 peces por grupo experimental.
- b) El desafío debería causar al menos el 60% de morbilidad o mortalidad en el grupo de peces controles y en un periodo de tiempo similar al de una infección natural.
- c) Las causas de las mortalidades deben ser determinadas.
- d) Las infecciones inespecíficas no deberían exceder el 10% en cualquier grupo.
- e) La mortalidad del grupo vacunado debería ser inferior al 24% para poder considerar el test como positivo.

La vacuna ideal contra IPNV debe inducir temprana protección, prevenir la formación de portadores, e inducir inmunidad contra un gran número de serotipos (Leong y Fryer, 1993). La efectividad de una vacuna no solo depende de que esta sea buena, sino que además de su correcta aplicación, el uso en el momento adecuado y del buen manejo de los peces (Palacios, 2001).

Debido al impacto que tiene la Necrosis Pancreática Infecciosa en Chile se hace necesario evaluar vacunas experimentales que pudieran ayudar en la prevención y control de esta enfermedad. A futuro la expectativa en el área de la prevención sanitaria es que no solo exista una mayor cantidad y diversidad de productos, si no que las innovaciones masivas provengan de la disponibilidad de vacunas bivalentes y polivalentes. Al respecto ya hay firmas desarrollando este tipo de vacunas (Palacios, 2001; Ruiz, 2001).

Para este trabajo se formuló la siguiente hipótesis:

Las vacunas experimentales C y D para IPN, otorgan protección a los peces de la especie Salmón Atlántico (*Salmo salar*), vacunados y desafiados con el serotipo Sp del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV).

Por tal motivo se planteó como objetivo evaluar la potencia de dos vacunas experimentales para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), a través de la determinación del Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS) en peces vacunados y no vacunados desafiados con la cepa Sp de IPNV en agua de mar.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. VIRUS Y LÍNEAS CELULARES

En esta investigación se trabajó con un aislado nacional del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) de S. Atlántico (*Salmo salar*) serotipificado Sp, mantenido en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

Se usó la línea celular de peces CHSE-214. La temperatura para la mantención y multiplicación de las células fue de 20 °C y para la inoculación viral de 15 °C. La inoculación se realizó en una monocapa celular utilizando un medio de cultivo MEM (Minimun Essential Médium), a esto se le adicionó suero fetal bovino en un 10% en el caso de cultivo celular y un 2% cuando se trató de titulaciones virales. Además, se adicionaron antibióticos para limitar el crecimiento bacteriano, utilizando penicilina y estreptomycinina en concentraciones de 100UI / ml y 100ug / ml de medio, respectivamente.

### 4.2 VACUNAS

Se utilizaron las vacunas experimentales bivalentes (IPN/SRS) C y D provistas por el fabricante, las cuales contienen antígenos del virus IPN más un adyuvante de aceite mineral. Se aplicaron intraperitonealmente en dosis de 0,2 ml / pez (dosis recomendada por el fabricante).

### 4.3 SOLUCIÓN FISIOLÓGICA

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

### 4.4 PECES

Se utilizaron 225 alevines de salmón Atlántico (*Salmo salar*), de la cepa Fanad, de desove nacional con un peso de 15–20 grs. Mantenidos en agua dulce, adicionalmente se utilizaron 30 peces al azar para realizar un chequeo sanitario, descartando así la presencia de agentes bacterianos, virales y parasitarios que pudieran inducir a error en el estudio, según procedimientos de la O.I.E (O.I.E, 2000).

#### **4.5 MATERIALES DE LABORATORIO**

Para la realización de este estudio, se utilizaron las dependencias, equipamiento y materiales del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, lo cual permitió realizar las inoculaciones de los peces, su mantención durante el periodo de prueba, necropsias, examen bacteriológico y virológico.

#### **4.6 TRANSPORTE Y CONTROL SANITARIO**

Los peces fueron trasladados desde una piscicultura sin historial de IPN, hasta la Sala de Estanques del Laboratorio de Ictiopatología. Se trasladaron en tambores de 250 l con un sistema de oxigenación. Se formaron 3 grupos de 85 peces en estanques de 500 l de agua, con aireación constante y con un sistema de filtros de carbón activado. El agua provenía de una vertiente, logrando así un recambio constante del agua. Se dispuso de un pediluvio y maniluvio con solución yodada para evitar la infección de los peces con cualquier otro microorganismo que pudiera afectar los resultados. Los peces fueron adaptados a su nuevo ambiente durante un mes. Previo a la vacunación se hizo un chequeo sanitario de 30 peces, tomados al azar desde los estanques de 500 l, para constatar su estado de salud y la presencia del virus en estudio. Los peces fueron examinados tanto externa como internamente, observando tamaño, peso, continuidad de la piel, pérdida de escamas, integridad de aletas, opérculos, branquias y estado nutricional; se observó los órganos internos para así determinar alguna posible alteración. Se sembró una muestra de hígado, bazo y riñón de cada pez en agar TSA (agar soya – tripticase), incubado a 20 – 22 °C por 5 días, como control bacteriano y también en agar MAO para control de Flavobacterias, también se hicieron tinciones de Gram para el mismo propósito. Se tomaron muestras de contenido intestinal y branquias, para observar al microscopio la presencia de parásitos y la integridad de las últimas. También se colectaron muestras de riñón y bazo, para realizar un examen virológico, todo esto según procedimientos O.I.E (O.I.E, 2000).

#### **4.7 MUESTREO DE ÓRGANOS**

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

Riñón y bazo para examen virológico.

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

#### **4.8 EXAMEN VIROLÓGICO**

Las muestras de tejido se obtuvieron con la máxima esterilidad posible. Se obtuvieron pequeños trozos de riñón y bazo, se colocaron en un tubo con medio de cultivo MEM

(Minimum Essential Medium), al 2% de suero fetal adicionado de antibiótico. Se trabajó con un conjunto máximo de 5 peces provenientes de la mortalidad diaria por acuario, que se maceraron en un mortero adicionando arena estéril. El homogeneizado se centrifugó a 4000 rpm, luego se recuperó el sobrenadante y se congeló en tubos rotulados para su posterior utilización. Posteriormente se inoculó en una monocapa celular (CHSE-214) realizando la adsorción a 15°C por una hora y luego se observó efecto citopático (CPE) diariamente por 7 días, confirmando así la presencia o ausencia del virus.

#### 4.9 EXAMEN BACTERIOLÓGICO

Se utilizaron placas de agar TSA y agar MAO para determinar la presencia de bacterias en los tejidos de los peces moribundos y muertos, descartando así esta mortalidad.

#### 4.10 PRUEBA DE POTENCIA

##### 4.10.1 Vacunación

Antes de iniciar la prueba de potencia, los peces permanecieron durante un mes en adaptación y luego se inició la experiencia previo ayuno de 24 horas. Se utilizó como vía de inoculación la intraperitoneal, inyectando 0,2 ml de cada vacuna experimental y solución fisiológica al grupo no vacunado, con jeringas estériles de 1 ml e hipodérmicas de 23 G. Los peces se anestesiaron por baño con Benzocaína (BZ- 20<sup>®</sup>)<sup>1</sup> en dosis de 50 ppm. Todo lo cual se resume de acuerdo al diseño presentado en la tabla N° 1.

**Tabla N°1:** Grupos de vacunación para la prueba de potencia de las vacunas experimentales C y D en salmón Atlántico (*S. salar*) de 15-20 gramos inoculados intraperitonealmente y mantenidos en agua dulce.

Grupo	Agua	Dosis por pez	N° de peces
Vacunados C	Dulce	0,2 ml	75
Vacunados D		0,2 ml	75
No vacunado		0,2 ml	75

##### 4.10.1.1 Mantención

Una vez concluida la vacunación se suspendió la alimentación por otras 24 horas. Se mantuvieron en tres estanques de 500 l con aireación constante, filtros con carbón activado y un flujo constante de agua dulce proveniente de una vertiente. Se mantuvieron como mínimo 500° día, tiempo durante el cual se produce el desarrollo de inmunidad protectora por indicación del laboratorio fabricante de las vacunas experimentales. Se alimentaron con una

<sup>1</sup> Ethil P-Aminobenzoato.

Laboratorio Veteruímica.

Camino a Melipilla # 5641. Santiago- Chile.

dieta comercial al 2% del peso vivo; el alimento se administró dividido en dos raciones entregadas mañana y tarde. Se chequeó la temperatura dos veces al día, el oxígeno disuelto, DBO5 y pH del agua semana por medio, además se retiró la mortalidad diaria chequeándose las posibles causas con análisis bacteriológicos y virales.

#### 4.10.2 Desafío

Luego de transcurrido como mínimo 500° día (lo que equivale a 50 días a 10 °C de temperatura de agua), se realizó el desafío (70 peces de cada grupo experimental previa selección de los peces en mejores condiciones sanitarias) en duplicado mediante inoculación intraperitoneal del virus IPN con una dosis de  $10^{5,6}$  TICD<sub>50</sub> / 0,2 ml / pez, utilizando como anestesia el producto comercial BZ- 20® en dosis de 50 ppm. Posteriormente los peces así desafiados se mantuvieron en agua de mar a 26‰ de salinidad.

Este procedimiento se realizó de la siguiente manera.

**Tabla N°2:** Metodología de inoculación de IPNV- Sp para el desafío de salmón Atlántico (*S. salar*) de 30-40 gramos vacunados y no vacunados mantenidos en agua salada.

Vacuna	Tipo de agua	Dosis por pez	Acuario	Nº de peces
C	Salada	$10^{5,6}$ TICD <sub>50</sub>	C1	35
			C2	35
D	Salada	$10^{5,6}$ TICD <sub>50</sub>	D1	35
			D2	35
No vacunados	Salada	$10^{5,6}$ TICD <sub>50</sub>	N1	35
			N2	35

##### 4.10.2.1 Mantenimiento post desafío

Los peces desafiados fueron trasladados a los 6 acuarios (35 peces cada uno) de 80 l. con recirculación de agua por medio de filtros de carbón activado, se utilizó aireación constante además de un sistema de aireación de emergencia. Los acuarios contenían agua salada (15‰ salinidad) al inicio del desafío hasta llegar paulatinamente a 26‰ la que se recambió en dos tercios cada 4 días. Su alimentación continuó siendo la dieta comercial al 2 % de su peso. Además se siguieron chequeando tanto los parámetros diarios como los semanales del agua. El agua eliminada se desinfectó con cloro a una concentración de 50 ppm por litro durante 24 horas. Los peces moribundos y muertos fueron examinados siguiendo el procedimiento ya descrito. Luego de 45 días posterior al desafío, se sacrificaron todos los peces sobrevivientes y se les realizó un examen virológico a través de cultivo celular en pool de órganos (riñón y bazo) para determinar la presencia viral.

##### 4.10.3 Cálculo del Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS)

Se determinó la efectividad de las vacunas experimentales por el método de Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS), (ELLIS, 1988), que se expresa en la fórmula siguiente:

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

Tanto para los grupos vacunados con C como con D la ecuación correspondió a 1 menos el porcentaje de mortalidad de cada uno de los correspondientes, dividido por el porcentaje de mortalidad del grupo no vacunado multiplicado por 100.

Para el cálculo de RPS solo se consideraron las muertes específicas por IPNV a partir del día 0 del desafío hasta el día 45 de término del experimento.

#### **4.10.4 Reaislamiento y confirmación viral**

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

##### **4.10.4.1 Aislamiento en cultivo celular**

De los peces moribundos y muertos, se tomó un trozo de aproximadamente 0,5 - 1 gr de riñón y bazo. Se maceraron en un mortero con arena esterilizada. Tras una homogenización completa, se añadió 9 ml de MEM (al 2% de suero fetal bovino) y antibiótico (100 UI de penicilina y 100  $\mu$ g de estreptomycin por ml).

El homogeneizado fue centrifugado a 4000 r.p.m. durante 10 minutos a 6°C, conservando el sobrenadante.

Con el sobrenadante en MEM 1/10, se diluyó 1/100, inoculando las células a 15°C (línea celular CHSE-214), crecidas en 18 hs en placas de cultivo celular.

Una vez alcanzado el tiempo de absorción del virus (15°C / 1 hora), se añadió en cada pocillo 1 ml de MEM con 2% suero fetal bovino. La placa fue mantenida a 15°C en cámara de incubación y observada diariamente hasta la aparición de efecto citopático. Se realizaron 2 pasajes de cada muestra de peces desafiados.

Además, para confirmar la replicación viral en los peces inoculados en el desafío, se tomaron muestras de riñón de 5 peces para realizar titulación de IPNV por gramo de órgano.

##### **4.10.4.2 Titulación viral**

El título viral se obtuvo a través de diluciones seriadas de las muestras según Reed y Muench (1938); para ello se realizaron diluciones en base 10, luego se agregó 0,1 ml de cada una de estas diluciones a un pocillo de una microplaca de titulación que contiene una monocapa de células CHSE-214, de 18- 20 horas de incubación. Cada dilución se sembró en triplicado, luego se esperaron 2 a 3 días con un máximo de 7 días para realizar la lectura de CPE (efecto citopático). El cálculo del título viral se expresó en TICD<sub>50</sub> / ml.



#### **4.10.4.3 IFAT- IPNV (Test de Inmunofluorescencia Indirecta para IPNV)**

Para esta prueba, se utilizó una placa con un marcado CPE (efecto citopático) obtenida a través de cultivo celular y el test IFAT se realizó con un kit comercial para la detección de IPN (BioX<sup>®</sup>)<sup>2</sup> (anexo N° 1).

---

<sup>2</sup> @BioX, Bio-fluo IPN  
30 Hoogveldlaan  
1700 Dilbeek, Belgica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PRUEBA DE POTENCIA

Se observó escaso apetito de los peces en la etapa de aclimatación, por lo cual la alimentación se entregó de acuerdo a la respuesta de los peces.

Los resultados del chequeo sanitario fueron negativos. Sin embargo, se observó focos de melanización en las muestras de órganos teñidos con Gram.

Durante el periodo post vacunación se produjo nuevamente una disminución del consumo de alimento, el que se normalizó después de una semana. No se constató mortalidad durante este periodo que duró 163 días, en el cual se registraron 2024° día.

En el anexo 2 y Figura 1 se grafican las temperaturas del agua en las etapas de vacunación y desafío, respectivamente. En el anexo 3 se resumen los rangos de los parámetros medidos en el agua durante la etapa de vacunación y desafío.

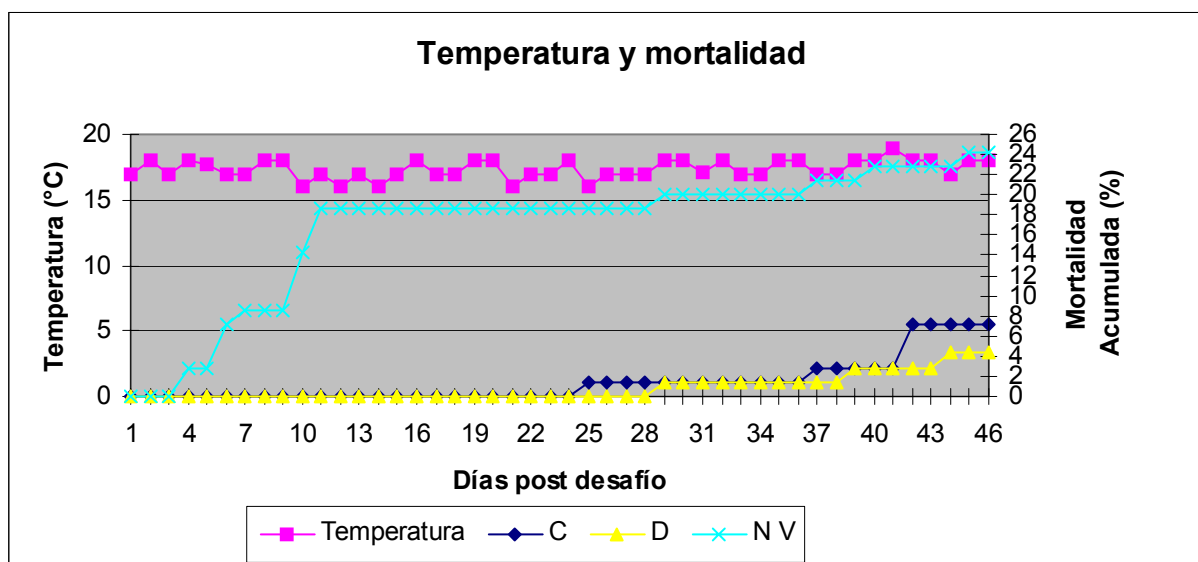
#### 5.1.1 Mortalidad

En la tabla N° 3 se aprecia la suma de la mortalidad diaria y acumulada registrada post desafío con IPNV-Sp de los acuarios en duplicado (anexo N°4) de los peces no vacunados inoculados con solución fisiológica y vacunados con las vacunas experimentales C y D mantenidos en agua de mar.

En la figura N°1 se grafican los promedio de mortalidad diaria acumulada en Salmones del Atlántico de 30-40 g vacunados con los productos experimentales C y D y no vacunados post desafío con IPNV Sp en agua salada.

**Tabla N° 3:** Sumatoria de mortalidad diaria (d) y acumulada (a) de S. del Atlántico (*Salmo salar*) de 30-40 g vacunados con los productos experimentales C y D y no vacunados post desafío con el serotipo Sp de IPNV en agua de mar.

Días post desafío	Vacunados				No vacunados	
	D		D		NV	
	d/a	%	d/a	%	d/a	%
3	0/0	0	0/0	0	2/2	2,85
5	0/0	0	0/0	0	3/5	7,14
6	0/0	0	0/0	0	1/6	8,57
10	0/0	0	0/0	0	4/10	14,28
11	0/0	0	0/0	0	3/13	18,57
26	1/1	1,42	0/0	0	0/13	18,57
29	0/1	1,42	1/1	1,42	1/14	20,00
37	1/2	2,85	0/1	1,42	1/15	21,42
39	0/2	2,85	1/2	2,85	0/15	21,42
40	0/2	2,85	0/2	2,85	1/16	22,85
41	2/4	5,71	0/2	2,85	0/16	22,85
42	1/5	7,14	0/2	2,85	0/16	22,85
44	0/5	7,14	1/3	4,28	0/16	22,85
45	0/5	7,14	0/3	4,28	1/17	24,28
<b>total</b>	<b>5</b>	<b>7,14</b>	<b>3</b>	<b>4,28</b>	<b>17</b>	<b>24,28</b>



**Figura 1:** Temperatura y promedio de mortalidad diaria acumulada en Salmones del Atlántico de 30-40 g vacunados con los productos experimentales C y D y no vacunados post desafío con IPNV Sp en agua salada.

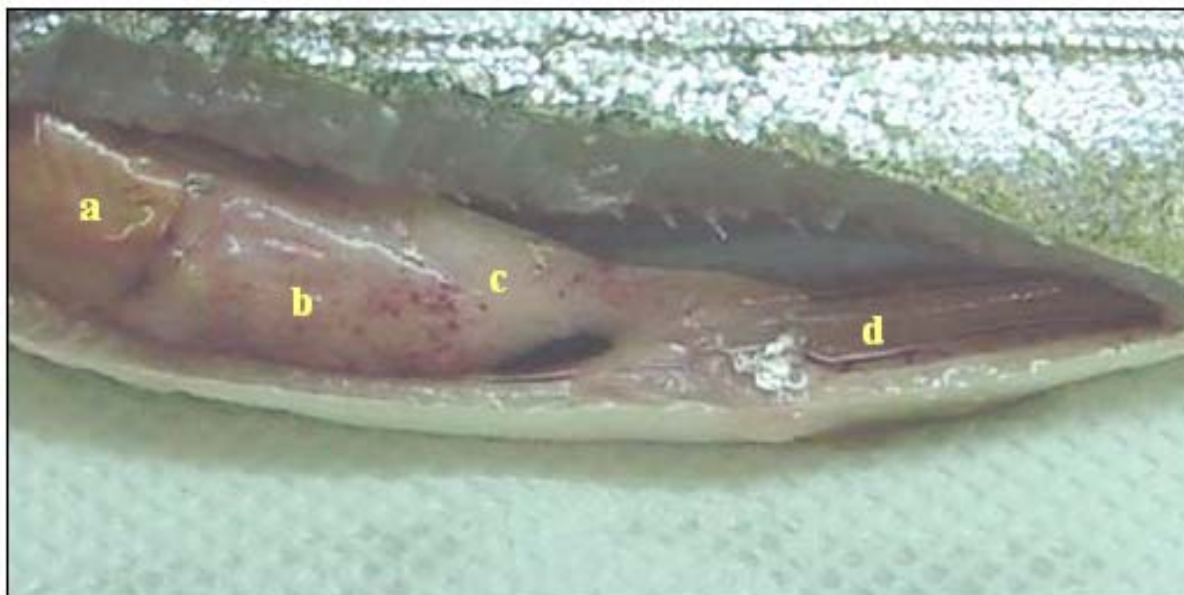
En el grupo de peces inmunizados con la vacuna experimental C, la mortalidad comienza el día 26 post-inoculación (p.i.), registrando un promedio de mortalidad diaria acumulada de 7,14%. En el grupo inoculado con la vacuna experimental D, la mortalidad se inicia el día 29 p.i., alcanzando un promedio de mortalidad diaria acumulada de 4,28%. En tanto que en el grupo de peces no vacunados, la mortalidad se inicio el día 3 p.i., extendiéndose hasta el término del experimento, alcanzando la mortalidad diaria acumulada de los duplicados un promedio de 24,28%.

## 5.1.2 Confirmación de la mortalidad por IPN

### 5.1.2.1. Signología

Con respecto a las manifestaciones clínicas de los peces desafiados con el virus IPN, en los peces vacunados fueron muy poco manifiestas. En el caso de los peces no vacunados moribundos los signos observados fueron los siguientes: inapetencia, letárgica, movimientos rotatorios sobre su mismo eje como también de problemas de balance; externamente oscurecimiento de la piel, palidez branquial y leve exoftalmia; internamente el estómago sin contenido, el hígado pálido, enteritis y ausencia o muy escasa cantidad de contenido, esplenomegalia, ciegos pilóricos con hemorragias petequiales.

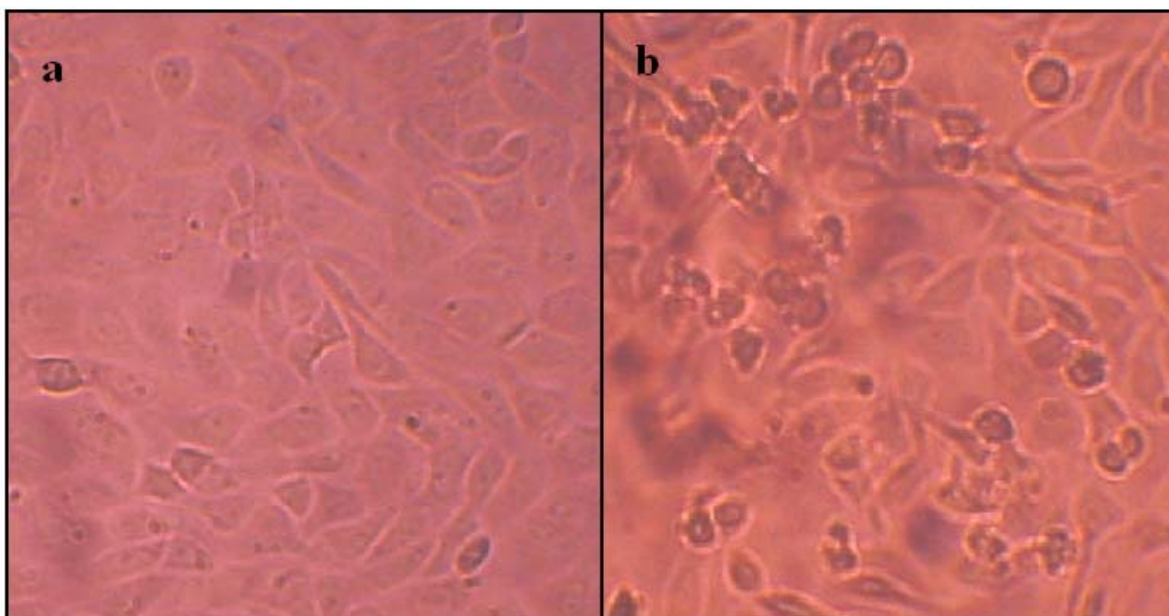
Algunos hallazgos durante la necropsia de peces no vacunados post-infección con IPNV se observan en la figura 2.



**Figura 2: Salmón Atlántico (*Salmo salar*) de 30-40 gramos inoculado con virus IPN serotipo Sp. Se aprecia hígado pálido (a), equimosis en ciegos pilóricos (b) y grasa adyacente (c) además enteritis (d).**

### 5.1.2.2. Reaislamiento

De las muestras provenientes de la mortalidad diaria, se reaisló el virus a través de cultivo celular, donde en la totalidad de los peces moribundos y desafiados se observó replicación viral en cultivo de células CHSE-214, observándose la expresión de CPE 48 horas después de infectar la monocapa, visualizándose espacios vacíos entre ellas. En la figura 3a se aprecia una monocapa celular no infectada y en la figura 3b una monocapa infectada con IPNV.



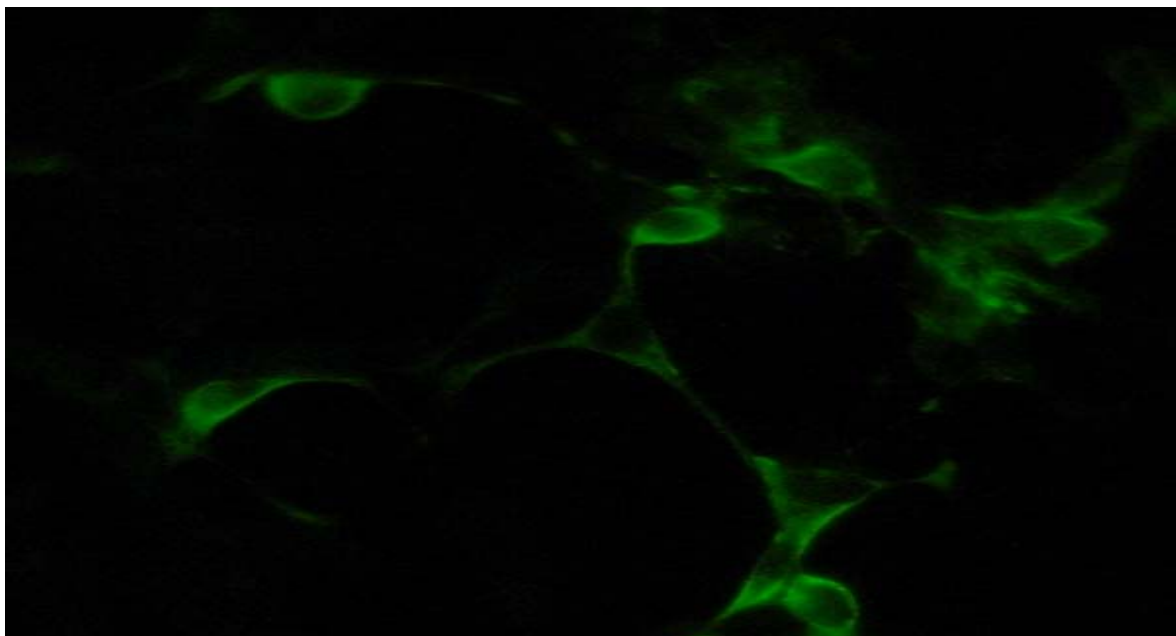
**Figura 3: Monocapa celular de CHSE-214 no infectada (a) 400X. Monocapa celular de CHSE-214 con efecto citopático después de 3 días de infección con IPNV – Sp. (b) 400X.**

### 5.1.2.3. Titulación viral

Las muestras de riñón de 5 peces moribundos, las cuales fueron tituladas por gramo de órgano, resultaron con títulos de  $3 \times 10^5$  a  $3 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> de IPNV / gramo.

### 5.1.2.4. IFAT/IPNV (Test de Inmunofluorescencia Indirecta para IPNV)

Se confirmó por IFAT / IPNV que el CPE del cultivo celular fue producido por IPNV, como se muestra en la figura 4, que permite visualizar una fluorescencia específica intracitoplasmática.



**Figura 4: Células CHSE-214 con fluorescencia intracitoplasmática específica de IPNV.**

### 5.1.3 Resultados del RPS

A partir de los resultados de mortalidad presentados en la tabla N° 3, se determinó el Porcentaje Relativo de Supervivencia de las vacunas experimentales C y D en agua salada.

% Mortalidad peces vacunados con C en agua salada: 7,14

% Mortalidad peces vacunados con D en agua salada: 4,28

% Mortalidad peces no vacunados en agua salada: 24,28

**RPS vacuna C:**  $1 - \frac{7,14}{24,28} \times 100 = 70,5\%$

**RPS vacuna D:**  $1 - \frac{4,28}{24,28} \times 100 = 82,35\%$

## 5.2. ANALISIS DE SOBREVIVIENTES

Se sacrificaron los peces sobrevivientes el día 45 post desafío a los cuales se les realizó un examen virológico con el propósito de determinar el estado portador. El número de peces positivos de IPNV se presenta en la tabla N° 4, así como también la mortalidad en los grupos experimentales.

**Tabla N° 4** Mortalidad y estado portador de Salmón Atlántico (*Salmo salar*) de 30 – 40 gramos vacunados y no vacunados sobrevivientes al desafío con el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa serotipo Sp en agua de mar.

Grupo	Positivos	Negativos	Mortalidad por IPNV	Total
Vacunados C	0	65	5	70
Vacunados D	0	67	3	70
No vacunado	10	43	17	70
Total	10	175	25	210

En la tabla N° 4, se aprecia que en los peces sobrevivientes de los grupos vacunados no se detectaron positivos a IPNV y en el grupo no vacunado se detectaron 10 peces positivos que corresponde al 18,8 % de los sobrevivientes de dicho grupo.

## 6. DISCUSIÓN

La vacunación es uno de los mejores métodos usados para la prevención de las enfermedades, al disminuir la frecuencia de peces infectados, como también bajando el título viral y de esta manera favoreciendo que los peces puedan desarrollar una defensa contra los patógenos (Christie, 1997). Por este motivo se evalúan vacunas para su uso en peces y en este trabajo para la prevención de IPN en Salmón del Atlántico, que es la especie de mayor importancia económica en nuestro país.

Los resultados negativos del chequeo sanitario da seguridad de que los peces estaban libres de enfermedades bacterianas, virales y parasitarias, que pudieran haber provocado resultados erróneos producto de un deterioro de la salud de los peces. Los focos de melanización observados en las muestras de órganos al igual que el escaso apetito mostrado por los peces a su llegada al laboratorio y después de la vacunación, son producto de una respuesta al estrés provocado por los manejos realizados en dichas etapas.

La prueba de potencia es uno de los métodos utilizados para evaluar la eficacia de las vacunas en peces, a través del cálculo del Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS) que expresa el nivel de protección que puede otorgar una vacuna. Sin embargo, el RPS puede variar significativamente entre un ensayo y otro con una misma vacuna (Nordmo, 1997). El primer protocolo para inducir mortalidad por IPN en salmón del Atlántico fue desarrollado por Taksdal y col. (1998) en post-smolt a través de inyección intraperitoneal y cohabitación con IPNV. Posteriormente Bowden y col. (2002), desarrollaron un protocolo para inducir mortalidad por IPN en post-smolt que no habían sido previamente expuestos a IPNV. Sin embargo, debido a que los resultados de cada experimento dependen de las condiciones de los peces (especie, edad, estado de madurez, exposición temprana a agentes infecciosos), del agente (serotipo, cepa, grado de atenuación durante el cultivo celular, concentración y virulencia), del método de infección (baño, cohabitación, inyección) y del medio ambiente (temperatura, calidad del agua, alimentación y otros manejos) no se ha podido estandarizar un modelo experimental repetible que permita comparar los resultados de diferentes investigaciones (Frost y Ness, 1997; Taksdal y col., 1998; Taksdal, 1999; Bowden y col., 2002).

Debido a que las vacunas experimentales a prueba son inyectables y presentan un adyuvante en base oleosa, se utilizaron peces de 15 a 20 gramos ya que en peces de menor talla se ha demostrado que el adyuvante puede producir una peritonitis local que termina con adherencias que implican órganos internos y pared abdominal, melanosis debido a una gran producción de melanomacrófagos y granulomas extensos en algunos casos, lo que en definitiva se transforma en menor crecimiento de los peces y mortalidad (Midtlyng y col., 1996). Por lo tanto es objetivo de estas vacunas es prevenir los brotes de IPN post transferencia al mar.



El virus utilizado en el desafío correspondió a un aislado nacional serotipo Sp, ya que este serotipo está implicado en el 60 – 70 % de los brotes de IPN en Chile (Dr. R. Enríquez, Comunicación personal)<sup>3</sup>

La mortalidad en el desafío se caracteriza porque comienza en el grupo no vacunado el día 3 post desafío, esto se asemeja a lo informado por otros autores (Stangeland y col., 1996; Taksdal y col., 1997; Bowden y col., 2002) en que las mortalidades se inician después de periodos similares dependiendo del tamaño de los peces, dosis viral y estrés a que son sometidos. En los peces inmunizados con las vacunas C y D, las mortalidades se inician cuando ya habían transcurrido 26 y 29 días de desafío. Según Stangeland y col. (1996) la infección por IPN reduce la capacidad osmorregulatoria, al dañar el tejido renal, lo que explicaría el inicio más temprano de la mortalidad en el grupo no vacunado. Se puede establecer que los grupos vacunados con C y D, presentan promedios de mortalidades acumuladas (7,14 y 4,28 %, respectivamente) inferiores a la registrada en los no vacunados (24,28 %).

La dosis infectante de IPNV utilizada como dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) resultó ser insuficiente bajo las condiciones en que se desarrolló este estudio. Según Christie (1997) la enfermedad en presmolt y smolt de S. del Atlántico se desarrolla por la exposición directa al virus asociado a la presencia de una serie de factores propios del pez, del agente infeccioso y del medio ambiente. Es así como en un estudio realizado por San Martín (2001), con una dosis viral menor a la utilizada en este estudio obtuvo un 71,42% de mortalidad en un pre-desafío en peces de 15-20 gramos en agua dulce, la cual posteriormente solo provocó un 32,86% de mortalidad durante el desafío.

En este estudio las medidas de manejo a que fueron expuestos los peces durante el desafío como: utilización de un ambiente salino, aumento de la densidad al utilizarse acuarios y disminución de la calidad del agua en algún grado al emplearse un sistema de recirculación de agua pudieron causar una reacción de estrés de diversa intensidad que a su vez disminuye la respuesta contra el agente (De Kinkelin y col., 1991) aún cuando los parámetros del agua se mantuvieron dentro de los rangos de referencia. (Ver anexo 3)

Debido a que el virus IPN es eliminado a través de las heces y orina de peces enfermos y clínicamente sanos (Roberts, 1989), la utilización de un sistema de recirculación de agua permite un aumento de la carga del agente por acumulación en el medio, lo que habría causado una reinfección y de esta forma se habría favorecido en algún grado al aumento de las mortalidades.

Dorson (1987), menciona que las cualidades físico-químicas del agua no influyen aparentemente sobre la susceptibilidad de los peces a IPN debido a que la enfermedad ocurre en aguas con óptimas condiciones para el desarrollo de salmónidos. Sin embargo, el rol de la temperatura es importante en el desarrollo de la enfermedad (Frantsi y col., 1971); Dorson y Torchy (1981) sostienen que la enfermedad se desarrolla a temperaturas por debajo de los

---

<sup>3</sup> Dr. Ricardo Enríquez, Inst. Pat. Animal, Universidad Austral de Chile.

16°C. Dorson (1987), afirma que esto puede no ser tan exacto para todos los serotipos de IPNV. Sin embargo, estudios epidemiológicos han revelado que IPN clínico tiene su mayor impacto en los meses de verano, indicando una asociación de la temperatura con la enfermedad. Por su parte McAllister y col. (1994) informaron que cuando truchas jóvenes infectadas naturalmente fueron sometidas a un cambio de temperatura de 12 a 18 °C, más la influencia de un inmunosupresor, la prevalencia y títulos virales se incrementó significativamente.

Ya que los tres grupos fueron sometidos a condiciones similares, las diferencias en el inicio como en la magnitud de las mortalidades entre los grupos vacunados y no vacunado sería consecuencia de la inmunidad protectora otorgada por las vacunas experimentales.

Según Christie (1997) la inmunidad protectora por vacunación puede ser dependiente de ambas respuestas inmunes, humoral y celular, que pueden ser dependientes de diferentes determinantes antigénicos virales, además sostiene que la proteína de la capsida VP2 parece contener el determinante antigénico dominante del virus IPN, el que es neutralizado por las células B. Según Frost y Ness (1997) algunos determinantes antigénicos de la proteína de la capsida VP2 pueden estimular directamente las células B o después de la degradación y presentación por una célula presentadora. A pesar de toda la investigación, la importancia de los anticuerpos en una respuesta inmune protectora contra IPN es controvertida, Yamamoto (1975) encontró una correlación entre la eliminación del virus y el nivel de anticuerpos neutralizantes en trucha arcoiris, sin embargo, no hay evidencia en otros salmónidos (Reno, 1976; Smail y Munro, 1985). Bootland y col (1995) inmunizaron truchas café adultas con una alta dosis de IPNV inactivado que indujo una alta respuesta inmune humoral cuyos anticuerpos neutralizaron IPNV, sin embargo, los anticuerpos no previnieron la infección post desafío. Un estudio realizado por Frost y Ness (1997), demostró que la vacunación de salmones con una vacuna multivalente conteniendo rVP2 suprimió la replicación viral de IPNV post desafío. Según estos investigadores células B con anticuerpos específicos contra IPNV pueden probablemente producir anticuerpos rápidamente, pueden opsonizar las células infectadas por IPNV y el virus libre, estos anticuerpos además pueden estimular la actividad de macrófagos e inducir la producción de linfocinas y activar una respuesta inmune celular.

En condiciones naturales brotes agudos de IPN con alta mortalidad son observados en alevines de primera alimentación y en peces durante el primer año en agua de mar, en cuyos peces la signología clínica es bien manifiesta (Christie, 1997; Plumb, 1999). Sin embargo, en la presente investigación como en las realizadas por Calderon (1998), San Martín (2001) y Mancilla (2001) la signología fue poco manifiesta. Roberts (1989) menciona que los signos de la Necrosis Pancreática Infecciosa pueden variar dependiendo de la especie afectada, del serotipo del virus y de las condiciones medio ambientales como la temperatura, contenido de oxígeno del agua y densidad de la población. En este estudio la signología clínica poco manifiesta puede explicarse por el tamaño de los peces (30-40 g.), ya que los peces más susceptibles son los de primera alimentación (Fenner y col., 1993), como también por efecto de la temperatura (18 °C), que se describe en el rango superior a la acción del virus IPN (Quaglio, 1989), además Taksdal (1999) afirma que la virulencia de la cepa disminuye a

través de los pasajes celulares cosa que ocurrió en esta experiencia, estos factores también explicarían las bajas mortalidades alcanzadas en todos los grupos de este estudio.

El reaislamiento viral fue realizado a través de cultivo celular, en donde se expresó efecto citopático en todas las muestras provenientes de la mortalidad diaria, tanto de los grupos vacunados como de los no vacunados, 48 horas después de infectar la monocapa (CHSE-214). Estos resultados fueron corroborados a través de IFAT-IPNV en donde se encontró que la totalidad de las muestras analizadas resultaron positivas a la presencia viral. De esta forma se pudo verificar que el virus IPN fue capaz de infectar y provocar mortalidad en los peces.

Para controlar que la presencia viral correspondió a la replicación viral y no solo la detección del virus inoculado, se realizó titulación del virus por gramo de órgano. Los títulos que se encontraron en los 5 peces muertos estaban entre  $3 \times 10^5$  a  $3 \times 10^6$  TICD<sub>50</sub> por gramo de órgano, con lo cual se confirma la replicación viral en los peces desafiados. Por su parte Taksdal y col. (1998), encontraron títulos de  $4,7 \times 10^6$  TICD<sub>50</sub> en muestras analizadas provenientes de smolt muertos y moribundos y en muestras provenientes de peces clínicamente sanos, los títulos fluctuaban entre  $< 5 \times 10^2$  a valores tan altos como en los encontrados en los peces muertos durante el desafío, lo que muestra una gran variación individual.

El nivel de protección que puede otorgar una vacuna se puede evaluar a través del Porcentaje Relativo de Sobrevivencia, el cual según Nordmo (1997) puede ser clasificado en tres categorías.

RPS < 70 = Vacunación Deficiente.

RPS > 70 = Vacunación Suficiente.

RPS > 80 = Vacunación Exitosa.

De acuerdo a esta clasificación, la vacuna experimental C resultó ser una vacunación suficiente debido a su RPS de 70,5 % en tanto que la vacuna experimental D corresponde a una vacunación exitosa, ya que el RPS resultante fue de 82%. San Martín (2001) y Mancilla (2001) han obtenido RPS similares en S. Atlántico desafiados en agua de mar. Christie (1997) informa la presentación de un brote natural de IPN en un grupo de peces vacunados con rVP2 y al registrar la mortalidad, el RPS resultante fue de aproximadamente 60%.

Una de las bases descritas por Ellis (1988) para considerar satisfactoria una prueba de vacunas en salmónidos, es que el nivel de mortalidad en el grupo no vacunado debe ser idealmente superior al 60%. Condición que también es considerada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para otorgar un permiso de comercialización de una vacuna inyectable. Debido a que el promedio de la mortalidad acumulada en el grupo no vacunado y desafiado con IPNV fue de un 24,28%, la evaluación de las vacunas experimentales C y D se considera como poco exigente, según lo expresado anteriormente.

Considerando las características epidemiológicas de IPN una vacuna debería cumplir con otros criterios para ser exitosa; entre ellos que tenga una inmunogenicidad efectiva, proteger al pez en etapas tempranas de su vida, permitir un rápido comienzo de la protección, ser de fácil administración (oral o mejor aún a través del agua antes de la primera alimentación), protección cruzada contra todos los serotipos relevantes, ser segura y por supuesto prevenir la formación de portadores. Con el objeto de evaluar este último criterio, se decidió una vez terminado el periodo de desafío (45 días) sacrificar los peces sobrevivientes. Se realizaron necropsias y examen virológico en grupos de 5 peces. Como se muestra en la tabla N° 4 en la totalidad de los peces vacunados no se detectó virus a través de cultivo celular, sugiriendo que ambas vacunas evitan la formación de portadores o que la concentración del virus estaba por debajo de la sensibilidad del análisis (Taksdal y col., 1998; Bowden y col., 2002). En tanto que en los sobrevivientes no vacunados se detectaron 10 peces portadores (18, 8%) de 53 peces sobrevivientes, de los cuales al menos 2 peces eran los realmente portadores de IPNV, ya que 2 pool de órganos analizados resultaron positivos en el cultivo celular.

Roberts (1989), sostiene que el estado portador puede ser detectado después de mucho tiempo post infección, desde plasma y leucocitos periféricos y puede afectar hasta el 90% de los sobrevivientes. En este estudio el estado portador debió haber sido analizado en forma individual y no en pool de órganos, además de haber sido reevaluado a través de pruebas serológicas, como lo sugieren Bowden y col. (2002).

En estos peces aparentemente sanos IPNV y anticuerpos específicos pueden coexistir por un largo tiempo (Bootland y col., 1990) y además el virus es comúnmente detectado con altos títulos (Christie, 1997; Taksdal y col., 1998). La importancia que reviste el estado portador es que estos peces pueden diseminar el virus provocando el contagio de peces sanos (Yamamoto, 1975) o bien sufrir una recrudescencia de IPN después de la transferencia al mar producto de la estimulación de las células que albergan el virus (Klein, 1985).

## CONCLUSIONES

No se pudo comprobar la hipótesis formulada, esto es las vacunas experimentales C y D otorgan protección a peces vacunados y desafiados con el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa. Ya que el desafío resultó poco exigente, debido a que bajo las condiciones en que se desarrolló este estudio, la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) utilizada fue insuficiente para obtener un 60% de mortalidad en el grupo no vacunado, requisito necesario para considerar satisfactoria la evaluación de una vacuna a través del RPS, aún cuando los RPS calculados para ambas vacunas experimentales resultaron > al 70%.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- BIOPLANET**, 2000. Larga vida al salmón.  
[www.bioplanet.net/magazine/bio\\_marabr\\_2000/bio\\_2000\\_marabr\\_reportaje.htm](http://www.bioplanet.net/magazine/bio_marabr_2000/bio_2000_marabr_reportaje.htm)
- BOOTLAND, L. M., P. DOBOS, R.M.W. STEVENSON.** 1990. Fry age and size effects on immersion immunization of brook trout, *Salvelinus fortinalis* Mitchell, against infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Dis.* 13: 113-125.
- BOOTLAND, L., M., DOBOS. P. & STEVENSON.** 1995. Immunization of adult brook trout, *Salvelinus fortinalis* (Mitchell), fails to prevent the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) carrier state. *J. Fish Dis.* 18: 449-458.
- BOWDEN, T., D. SMALL, A. ELLIS.** 2002. Development of a reproducible infectious pancreatic necrosis virus challenge model for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.* 25: 555-563.
- BRAVO, S.** 2000. Previniendo las enfermedades en la industria salmonera. *Chile acuicola*: 21-25.
- BUSTOS, P., J. MIDTYNG, C. MAYRA.** 1999. IPN: Un enorme desafío para la industria salmonera. *Aquanoticias Internacional* 48: 48-51.
- CALDERON, Y.** 1998. Determinación de la virulencia de dos cepas del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) en *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*. Tesis M. V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CARVAJAL, P.** 2000. Industria creciente, vacunas para la salmonicultura. *Salmonoticias* 83: 11-15.
- CHRISTIE, K.E.** 1997. Immunization with viral antigens: Infectious Pancreatic Necrosis. *Fish Vaccinology* 90: 191-199.
- DE KINKELIN, P., CH. MICHEL, P. GHITTINO.** 1991. Tratado de las enfermedades de los peces. Ed Acribia S.A., Zaragoza, España.
- DORSON, M.,** 1987: Vaccination against Infectious Pancreatic Necrosis, in Ellis A. E. (ed): *Fish vaccination*. London, Academic Press, 1988, pp 162-171.
- DORSON, M. and TORCHY, C.,** 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) caused by and European strain of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 4: 213-221.

- ELLIS, A.E.** 1988. Optimizing Factors for Fish Vaccination. *Fish Vaccination* 3: 32-46.
- FENNER, F., E. P. GIBBS, F. MURPHY, R. ROTT, M. STUDDERT and D. WHITE.** 1993. *Veterinary Virology*. Ed. Academic Press, INC. San Diego, California.
- FRANTSI, C. & SAVAN, M.** 1971. Infectious pancreatic necrosis virus – temperature and age factors in mortality. *J. Wildlife Dis.* 7: 249-255.
- 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.
- KLEIN, R. J.,** 1985. Initiation and maintenance of lateral herpes simplex virus infections: The paradox of perpetual immobility and continuous movement. *Rev. Infec. Dis.* 7: 21-30.
- LEONG, J. C., J.L. FRYER,** 1993. Viral vaccines for aquaculture. *An. Rev. Fish Dis.* 3: 225-240.
- LOBOS, C.,** 2000. Situación clínica de IPN en centros de cultivos de salmonídeos en Chile. En Seminario internacional INTESAL. Situación epidemiológica chilena y mundial del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), estrategias de manejo y control, Puerto Montt, marzo-2000.
- LOZANO, M.,** 2000. Compendio de la acuicultura y la pesca en Chile. Ed. Aquanoticias, Santiago, Chile: 19-134.
- 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. E. AND X. REYES.** 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* 7: 319-322.
- McALLISTER, P., OWENS, W. AND RUPPENTHAL, T.** 1987. Detection of infectious pancreatic necrosis virus in polluted cell and particulate components from ovarian fluid of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Dis. Aquat. Org.* 2: 235-237.
- McALLISTER. E.,** 1988. Infecciones viricas en peces cultivados. Patología en Acuicultura. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.

- McALLISTER, P. E., W. J. OWENS AND W. B. SCHILL.** 1994. Effects of water temperature and immunosuppressant treatment on prevalence and titer of infectious pancreatic necrosis virus in naturally infected brook trout. *Journal Of Aquatic Animal Health* 6: 133-137.
- MIDTLYNG, P.J., L.J REITAN, L. SPEILBERG,** 1996. Efficacy and side-effects of injectable furunculosis vaccines in Atlantic Salmon *Salmo salar*. *Fish Shellf. Immunol.* 6: 335-350.
- NORDMO, R.** 1997. Strengths and Weaknesses of Different Challenge Methods. In Gudding, R., A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, F. Brown. *Fish Vaccinology*, Karger, Basel.
- OGANIZACION INTERNACIONAL DES EPIZOOTIAS (OIE).** 2000. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. 3° Edition. Ed. by the O.I.E. fish diseases dominion, Paris, Francia.
- PALACIOS, S.** 2001. Vacunas para salmones: Que ofrece Chile a los productores. *Aquanoticias internacional* 62: 58-62.
- PARADA, G.** 2001. Vacunas de ADN: La nueva tendencia en Chile. *Salmonoticias.* 96: 16.
- PLUMB, J. A.** 1999. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. Iowa State University, 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 . Y MUENCH.** 1938. A simple method for stimating fifty percents and points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- RENO, P. W.** 1976. Qualitative and quantitative aspects of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) carrier state in trout. Ph. D. Thesis, University of Guelph, Ontario, Canadá.
- ROBERTS, R.** 1989. Fish Pathology. Ed . bailliere Tindall, London, Inglaterra.
- RUIZ, M.** 2001. Vacunas para una industria en expansión. *Salmonoticias* 102: 13-15.
- SANO, T.** 1995. Viruses and viral diseases of salmonids. *Aquaculture* 132: 43-52.
- SAN MARTIN, C.** 2001. Evaluación de una vacuna comercial para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

- SMAIL, D. A. and MUNRO.** 1985. Infectious pancreatic necrosis virus persistence in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: *Fish and Shellfish Pathology* (ed. by A.E. Ellis), pp. 277-288. Academic Press London.
- STANGELAND, K., S. HOIE, T. TAKSDAL.** 1996. Experimental induction of infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post smolts. *J Fish. Dis.* 19: 323-327.
- STOSKOPF, M.** 1992. *Fish Medicine*. Ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- TAKSDAL, T., A. RAMSTAD, K. STANGELAND, B. DANNEVIG.** 1998. Induction of infectious pancreatic necrosis (IPN) in covertly infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolt by stress exposure, by injection of IPN virus (IPNV) and by cohabitation. *J. Fish Dis.* 21: 193-204.
- TAKSDAL, T.** 1999. Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) in Atlantic Salmon: Infection trials pathogenesis and diagnostic methods. Thesis for the degree of dr. med. vet. Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, *Norway*. pp 6-23.
- WOLF, K.** 1988. *Fish viruses and fish viral diseases*. Ed. Ithaca, New York.
- YAMAMOTO, T.** 1975. Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carriers and antibody production in a population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.* 21: 1343-1347.



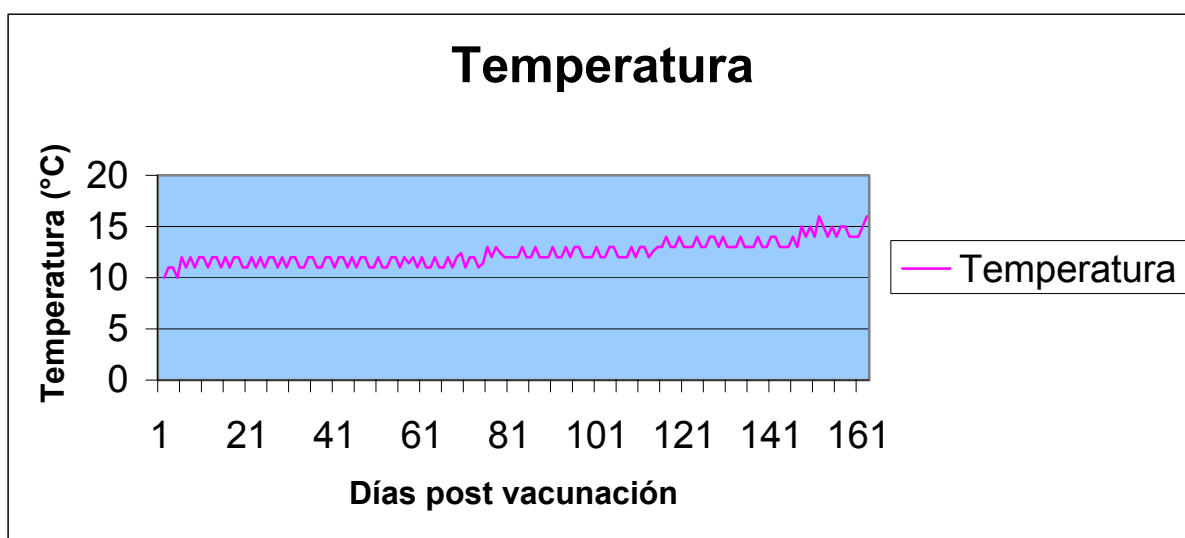
## ANEXO N° 1

### TECNICA IFAT-IPNV

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

## ANEXO N° 2

Variaciones diarias de la temperatura del agua durante el periodo post vacunación.



## ANEXO N° 3

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

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

Mediciones de algunos parámetros del agua durante el periodo de desafío con IPNV.

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

Los datos registrados en la tabla se encuentran dentro de los rangos permitidos para la especie según los parámetros de calidad de agua que se manejan en el Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

## ANEXO N° 4

Mortalidad diaria (d) y acumulada (a) en S. del Atlántico vacunados con vacunas experimentales C, D y no vacunados post desafío Intraperitoneal (i.p), con el serotipo Sp de IPNV, en agua de mar.

Días (p.i.)	Vacunados								No vacunados			
	C1		C2*		D1		D2*		NV 1		NV2*	
	d/a	%	d/a	%	d/a	%	d/a	%	d/a	%	d/a	%
3	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	2/2	5,71
5	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	3/3	8,57	0/2	5,71
6	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	1/4	11,42	0/2	5,71
10	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/4	11,42	4/6	17,14
11	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/4	11,42	3/9	25,71
26	1/1	2,85	0/0	0,00	0/0	0,00	0/0	0,00	0/4	11,42	0/9	25,71
29	0/1	2,85	0/0	0,00	1/1	2,85	0/0	0,00	1/5	14,28	0/9	25,71
37	1/2	5,71	0/0	0,00	0/1	2,85	0/0	0,00	1/6	17,14	0/9	25,71
39	0/2	5,71	0/0	0,00	0/1	2,85	1/1	2,85	0/6	17,14	0/9	25,71
40	0/2	5,71	0/0	0,00	0/1	2,85	0/1	2,85	0/6	17,14	1/10	28,57
41	0/2	5,71	2/2	5,71	0/1	2,85	0/1	2,85	0/6	17,14	0/10	28,57
42	0/2	5,71	1/3	8,57	0/1	2,85	0/1	2,85	0/6	17,14	0/10	28,57
44	0/2	5,71	0/3	8,75	0/1	2,85	1/2	5,71	0/6	17,14	0/10	28,57
45	0/2	5,71	0/3	8,57	0/1	2,85	0/2	5,71	1/7	20,00	0/10	28,57
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>5,71</b>	<b>3</b>	<b>8,57</b>	<b>1</b>	<b>2,85</b>	<b>2</b>	<b>5,71</b>	<b>7</b>	<b>20,00</b>	<b>10</b>	<b>28,57</b>

\* corresponde a los duplicados de los acuarios.

## AGRADECIMIENTOS

- ◆ Quiero agradecer a mis padres y hermanos por todo el apoyo que me han dado durante estos años, especialmente en los momentos difíciles. Los quiero mucho y ojalá siempre estén a mi lado.
- ◆ A mi profesor Dr. Ricardo Enríquez, por su buena disposición y enseñanzas. Muchas gracias por confiar en mí.
- ◆ A la señora Mónica, por toda la paciencia, enseñanzas y amistad.
- ◆ A Cristian, Esteban y Vania por toda la paciencia y apoyo brindado en mi estadía en el laboratorio de Ictiopatología. Fue un agrado compartir con ustedes.
- ◆ No puedo dejar de agradecer a mi amigo Mauricio por la cooperación brindada en la realización de la parte práctica de este trabajo y por su compañerismo.
- ◆ A mi amiga Paula, por quién siento un gran cariño, gracias por brindarme una palabra de aliento y una sonrisa cuando la necesitaba.