

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

**EVALUACIÓN DE CAMPO DE LA EFICIENCIA DE DOS VACUNAS
COMERCIALES PARA LA PREVENCIÓN DE LA VIBRIOSIS EN CHILE
PROVOCADA POR *Vibrio ordalii* EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).**

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

RODRIGO CÉSAR CRISTI QUIÑONES

VALDIVIA-CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enríquez S.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Patricio Esquivel S.

Nombre

Firma

Dr. Enrique Paredes H.

Nombre

Firma

FECHA APROBACIÓN:

13 de Enero de 2006

A mis padres

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSIÓN.....	21
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27
8. ANEXOS.....	32
9. AGRADECIMIENTOS.....	38

1. RESUMEN

Junto al desarrollo de la salmonicultura nacional han surgido patógenos responsables de masivas mortalidades, entre los que se encuentra *Vibrio ordalii*, que a partir del año 2003 se ha aislado desde salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), registrando mortalidades acumuladas promedio entre 5 y 22 %. En el presente ensayo se analizó la repuesta de dos vacunas contra Vibriosis, una vacuna autógena preparada a partir de *V. ordalii* (Vacuna A) y una vacuna bivalente comercial preparada a partir de *V. anguillarum* serotipo O2 α y virus IPN (Vacuna B), apoyándose en la reacción cruzada que existe entre estas dos bacterias.

Las vacunas se evaluaron mediante un estudio de campo en un centro de cultivo ubicado en Chiloé, X Región, Chile, empleando un grupo de peces controles vacunados con una virina de virus IPN (Vacuna C). Para este ensayo se utilizaron 425.500 ejemplares de salmón del Atlántico (*S. salar*) post-smolt de 120 g peso promedio. Los 3 grupos de peces fueron distribuidos en 3 balsas-jaula distintas: grupo vacuna A con 138.500 peces, grupo vacuna B con 144.000 peces y el grupo control (vacuna C) con 143.000 peces. Se retiraron los peces muertos de las jaulas en ensayo 2 veces por semana y se clasificó según la planilla de la empresa y aproximadamente cada 20 días se analizaron muestras de peces moribundos mediante análisis de laboratorio para confirmar la causa de mortalidad. Se registró diariamente la temperatura del agua.

La mortalidad de peces atribuible a Vibriosis provocada por *V. ordalii* del grupo vacuna A fue de 4,62%, del grupo vacuna B 6,24% y del grupo vacuna C 5,12%. Para medir la eficiencia de las vacunas en ensayo se calculó el RPS de las vacunas. Este indica que las vacunas fueron deficientes por RPS menores a 70%. Es necesario destacar que se realizaron dos terapias antibióticas, que se aplicaron en igualdad de condiciones para los tres grupos, lo que indica en sí, que las vacunas no fueron eficientes a la hora de controlar los brotes de la enfermedad y que las tasas de mortalidad por Vibriosis en los peces en ensayo fueron influidas por esta terapia.

Palabras clave: Evaluación campo, vacuna *Vibrio*, salmón Atlántico.

2. SUMMARY

FIELD EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF TWO COMMERCIAL VACCINES FOR THE VIBRIOSIS PREVENTION CAUSED BY *Vibrio ordalii* IN ATLANTIC SALMON (*Salmo salar*).

With the development of the Chilean salmon industry have arisen pathogenic agents producing massive mortalities, such as *Vibrio ordalii*, isolated since the year 2003 have been isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with 5 to 22 % cumulated mortalities . For this reason two vaccines were evaluated. One A them was an autologous vaccine prepared form *V. ordalii* (Vaccine A) and the other, a commercial bivalent vaccine prepared from *V. anguillarum* (serogroup O2 α) and IPN virus (vaccine B). This protocol was based on the cross-reaction between both bacteria.

The field study was carry out in aquaculture establishments located in Quinchao, X Region, Chile. Using as a control group of vaccinated fish with a virine of IPN virus (Vaccine C). For this assay, 425.500 fishes Atlantic salmon (*S. salar*), post smolt of 120 g average weight were used. The 3 groups of fishes were distributed in 3 different raft-cages, the Vaccine A group with 138,500 fish, the Vaccine B group with 144.000 fish and the fish of the control group (Vaccine C) with 143.000 fishes. Dead fishes were removed twice a week and classified according to the list of the company. Approximately every 20 days samples of dying fish were analyzed to confirm the mortality cause by means of laboratory analysis. The water temperature was registered daily.

Fish Mortality caused by Vibriosis provoked by *V.ordalii* from the injection A group was of 4,62%, the percentage of the injection B group was of 6,24%, and from the C group, 5,12%. To measure the efficiency of injections on rehearsals it was calculated the RPS of the injections. This indicates that the injections were deficient by RPS under 70%. It's necessary to indicate out that 2 antibiotic therapies were done, which were applied equally for the 3 groups, so this indicates that injections were not efficient at the time to control diseases and also that the mortality range by Vibriosis on fishes during rehearsals were influenced by this therapy.

Key words: Field trial, *Vibrio* vaccine, Atlantic salmon.

3. INTRODUCCIÓN

El gran desarrollo que ha experimentado la salmonicultura, especialmente en la zona sur de nuestro país, la ha convertido en una de las actividades de mayor desarrollo y productividad, generando un crecimiento económico importante en el producto interno bruto nacional, es así como Chile mantiene el segundo lugar en la exportación de salmones a nivel mundial (Lozano 2000).

En los primeros siete meses de 2005, los principales mercados de destino de las exportaciones en términos de ventas fueron Estados Unidos con un 37% del total de los ingresos, equivalentes a US\$ 331,1 millones, y Japón con el 36% correspondiente a US\$ 321,1 millones, más atrás se ubicó la Unión Europea con un 13% del total y retornos por US\$ 119,6 millones. Los principales envíos por especie correspondieron a *Salmo salar* con un 64% *Oncorhynchus mykiss* con un 22% y *Oncorhynchus kisutch* con el 14% (Aqua 2006).

Las enfermedades bacterianas constituyen un conjunto considerable en las enfermedades de los peces. Su importancia no está dada solamente por las pérdidas económicas que ocasionan en todo el mundo, cualquiera que sea el tipo de producción piscícola que se considere, sino igualmente por su impacto sobre poblaciones naturales de peces y por la amenaza sanitaria que directa o potencialmente, representan algunos gérmenes en la salud humana (Kinkelin y col 1985).

Existe evidencia de los primeros hallazgos de *V. anguillarum* en Chile en 1988 y 1989, donde a partir del tracto digestivo de *Mytilus chilensis* (chorito común) y de lesiones externas de un ejemplar de *O. kisutch* (salmón Coho) se aislaron dos cepas de *Vibrio anguillarum* (Carvajal y col 1989). En el año 1990 se realizó un estudio en la X Región, en las tres especies salmonídeas de mayor producción (*S. salar*, *O. kisutch* y *O. mykiss*) en búsqueda de *Vibrio spp.* El estudio concluyó que la totalidad de los peces no presentaban signología de Vibriosis, como tampoco fue posible aislar *Vibrio spp.*, *V. anguillarum* ni *V. ordalii* desde la sangre de estos (Muñoz 1990). Un reciente estudio de búsqueda de vacunas autógenas para la salmonicultura nacional, mediante secuenciación genética del ADN ribosomal 16S, de aislados de peces de planteles chilenos, ha identificado 2 bacterias del genero *Vibrio*: *V. ordalii* y *V. anguillarum* (*Listonella anguillarum*)¹.

¹ Hugo Zunino Comunicación personal. Veterquímica Ltda., Chile.

A partir del año 2003 se presentaron en Chile brotes de Vibriosis que afectaron inicialmente a salmón del Atlántico (*S. salar*), posteriormente a trucha arcoiris (*O. mykiss*) y salmón Coho (*O. kisutch*) cuya etiología era *Vibrio ordalii*. Los primeros hallazgos de la enfermedad fueron en julio – agosto de 2003 en el área de Quellón al sur de la Isla de Chiloé, provocando mortalidades promedio entre 5 y 22% (Colquhoun y col 2004, Godoy 2004).

La Vibriosis es una enfermedad de amplia distribución mundial, describiéndose por primera vez en 1718 como “Peste roja de la anguila”. Otros nombres que recibió fue “Furunculosis de agua salada” (Rucker 1963) y “Enfermedad del furúnculo” (Bagge y Bagge 1956). En un principio el agente fue clasificado como *Bacterium anguillarum* en 1893, el cual fue posteriormente reclasificado como *Vibrio anguillarum* (Bergman 1909).

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos curvos Gram negativos, no forman esporas y son móviles por la presencia de flagelos, son anaerobios facultativos, quimio-organotrofos, metabolismo fermentativo y la mayoría son oxidasa positiva. Sensibles al vibriostático 2.4- diamino- 6.7- diisopropyl pteruidinephosphate (0/129) y la novobiocina. Son ubicuitarios y su hábitat natural son los ecosistemas marinos y estuarinos. Muchas especies son patógenas para el hombre y para vertebrados e invertebrados marinos (Baumann y col 1984, Inglis y col 1993)

V. anguillarum y *V. ordalii* son bacilos curvados y anaerobios facultativos. *V. anguillarum* mide 0,5 x 1,0 a 2,0 μm y *V. ordalii* 2,5 – 3,0 x 1,0 μm . Ambos son móviles gracias a que poseen un flagelo polar (Post 1983, Austin y Austin 1999, Actis y col 1999, Plumb 1999). A través de los lipopolisacáridos conectados a la membrana exterior, se han distinguido 6 serotipos de *V. anguillarum*. *Vibrio ordalii* fue considerado en un principio como *V. anguillarum* biotipo II, pero Schiewe y col (1981) determinaron que era fenotípicamente y genéticamente distinto de *V. anguillarum* y por ende que se trataba de una especie distinta (Egidius 1987, Actis y col 1999, Austin y Austin 1999). *V. ordalii* y *V. anguillarum* comparten numerosas características biofísicas y bioquímicas, así como también reaccionan cruzadamente dado básicamente por los lipopolisacáridos de la pared celular bacteriana (Chart y Trust 1984, Muthiara y col 1993).

La epidemiología de *V. ordalii* es semejante a la de *V. anguillarum* (Roberts 2001). Se diferencian básicamente en que *V. anguillarum* constituye parte de la microflora normal de los ambientes marinos (West y Lee 1982, Muroga y col 1986) y de la microflora normal de los peces marinos (Oppenheimer 1962, Mattheis 1964), a diferencia de *V. ordalii* que es raramente aislado fuera del pez (Austin y Austin 1999). *V. anguillarum* es transmitido por la columna de agua y por el contacto de peces sanos con peces enfermos (Plumb 1999). Las vías de ingreso del patógeno no están claras todavía, pero se sospecha de la transmisión por vía oral (Paredes 2005).

La mayoría de las pérdidas atribuibles a Vibriosis ocurren post ingreso a agua salobre, aproximadamente a los 50 días post-traslado (Harrell 1978). A su vez se producen en la temporada estival cuando la temperatura de las aguas es alta y el oxígeno disuelto es más bajo. Altas densidades de cultivo o pobre higiene pueden contribuir a la epidemia (Plumb 1999).

V. anguillarum ha sido descrito como causante de brotes de Vibriosis en más de 30 especies de peces marinos (Toranzo y Barja 1990), dentro de las que se encuentran las tres especies de mayor importancia en la acuicultura nacional. Al respecto, *V. ordalii* se describe afectando principalmente a salmón Coho, aunque también afecta a salmón del Atlántico y trucha arcoiris (Godoy 2004).

Cuando el curso de la enfermedad es peragudo, se describe severa miocardiopatía, necrosis renal, esplénica y edema abdominal, sin signología externa (Actis y col 1999) Los primeros signos clínicos de los salmónidos *Vibrio* infectados, así como de otras especies infectadas, son anorexia, oscurecimiento de la piel, nado letárgico y muerte súbita (Novotny y Harrell 1975, Roberts 1981).

Al ser agudo el curso de la enfermedad, las lesiones de la piel comienzan con protuberancias oscuras que al ulcerarse liberan su contenido hemorrágico y pueden así exponer la musculatura. El tejido necrótico contiene un alto número de bacterias. Además de estos signos puede presentarse eritema en la base de las aletas, alrededor de la boca, con distensión intestinal con un fluido claro y viscoso (Austin y Austin 1999, Roberts 2001). Otras lesiones internas observadas son la dilatación y licuefacción del bazo y riñón, petequias en peritoneo visceral y parietal y hemorragias focales en la superficie del corazón (Inglis y col 1993).

Cuando el curso es crónico, las lesiones de la piel pueden ulcerarse comprometiendo la musculatura, se observa además opacidad corneal que puede llegar hasta la ulceración y pérdida del ojo (Inglis y col 1993). Las sucesivas hemorragias en la cavidad abdominal se convierten en adherencias entre las vísceras (Roberts 2001).

El diagnóstico presuntivo se realiza basándose en la signología clínica y la observación de los bacilos Gram negativos cortos o rectos a partir de frotis o improntas de los tejidos afectados. Una confirmación preliminar del agente se puede obtener valiéndose de la antigenicidad cruzada con *Vibrio anguillarum*, utilizando un test de aglutinación rápida (Godoy 2004).

El diagnóstico definitivo se hace por el cultivo de muestras de peces sospechosos, aislando el patógeno en medios de cultivo como agar soya tripticasa (TSA) agregándole 1-1,5% de NaCl, incubado a 20-25 °C durante 24-48 h. Las bacterias del género *Vibrio* son sensibles al vibriostático O/129, y sus principales características bioquímicas son tener un metabolismo fermentativo, oxidasa y gelatinasa positivo, y requiere Na^{+2} para su crecimiento (American Fisheries Society 1992). En el cultivo puro se desarrollan colonias lisas, brillantes, convexas, de 1 a 2 mm de diámetro, viscosas y adherentes, sin presentar color característico (Actis y col 1999).

El tratamiento y control de esta enfermedad se realiza básicamente mediante el uso de antibióticos por vía oral, los más usados son flumequina, oxitetraciclina, ácido oxolínico y florfenicol que normalmente son eficaces (Godoy 2004).

Entre las medidas de prevención se encuentra el uso de vacunas y autovacunas, asociadas a buenas prácticas de manejo. La vacunación es una de las herramientas de uso natural más eficaz en la prevención de enfermedades en cualquier programa de sanidad animal y humana que se instaure. Está establecido que su uso rutinario, dentro de un plan continuo de trabajo disminuye el riesgo de aparición de enfermedades que son endémicas (Carvajal 2000).

El Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) en el programa sanitario general de vacunaciones (PSGV) define como autovacuna a la “preparación antigénica cuya cepa actuante ha sido obtenida desde un centro de cultivo nacional y cuya elaboración y uso ha sido autorizada por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), previo informe técnico del Servicio. Para obtener esta autorización, el interesado deberá entregar al SAG la cepa del organismo actuante, acreditar que existen animales afectados por la correspondiente, que han sido tratados adecuadamente persistiendo la enfermedad y que no se encuentran en el mercado vacunas eficaces para combatirla. En este caso, el uso se restringe al centro de cultivo del cual se obtuvo la cepa y su elaboración y uso en el centro se establece por resolución del SAG, previo informe técnico del Servicio”.

Las vacunas pueden estar basadas en la administración de (Folch y col 2000):

1. Organismos vivos.
2. Organismos muertos o inactivados.
3. Productos metabólicos.
4. Antígenos.
5. Péptidos sintéticos.
6. Anticuerpos antiidiotípicos.
7. Inyección de DNA.

Por otra parte existen tres métodos de vacunación en peces (Carvajal 2000):

1. 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 pero provoca estrés en peces de peso ligero.
2. Por inmersión: Ideal para vacunar en forma masiva 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.
3. Por administración oral: No es estresante, permite vacunar peces de cualquier tamaño y puede ser menos potente que los otros métodos, sin embargo es difícil de asegurar que toda la población ingiera en forma suficiente la vacuna.

Una vacuna ideal debe dar una inmunidad fuerte y prolongada no causando efectos colaterales desfavorables; lamentablemente estas dos características tienden a ser mutuamente incompatibles. Así las vacunas vivas estimulan bien la respuesta inmunitaria, pero conllevan peligros debido a su virulencia residual; en tanto que las vacunas muertas son menos eficaces como inmunógenas, pero suelen ser mucho más seguras (Tizard 2004).

Algunos métodos para determinar la eficiencia 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 (1988a) 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 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.

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

respectivamente; en Chile existen vacunas de primera y segunda generación, utilizando adyuvantes que aumentan la capacidad inmunogénica de las vacunas (Carvajal 2000).

La aparición de nuevos agentes patógenos de salmonídeos en la industria salmonera chilena ha puesto en evidencia la necesidad de desarrollar mecanismos de protección que armonicen con las nuevas políticas del país en relación con los cuidados del medio ambiente y el uso limitado y racional de drogas antimicrobianas. Por esto el uso de vacunas para la prevención de enfermedades es hoy en día la alternativa más eficaz, que de igual modo responde con la necesidad de controlar emergencias sanitarias.

En la búsqueda de vacunas que funcionen de manera eficiente y segura, se hace necesario realizar estudios técnicos no solo en condiciones experimentales de laboratorio, sino que también en condiciones de producción intensiva. Este último estudio es quizás el de mayor importancia a la hora de elegir entre un espectro de vacunas comerciales disponibles en el mercado contra una mismo patógeno, ya que a la hora de elegir una vacuna, sin lugar a dudas que será escogido el producto con mayor número de experiencias de campo y mejores resultados, expresados básicamente en el bajo porcentaje de mortalidad de los grupos vacunados y desafiados.

La hipótesis de este estudio es: Las vacunas A y B son eficientes en proteger a los grupos de peces contra un desafío de Vibriosis.

El objetivo general de este estudio es evaluar la eficiencia mediante una investigación de campo de 2 vacunas desarrolladas para la prevención de Vibriosis, preparadas a partir de *V. ordalii* y *V. anguillarum* serotipo O2 α , en poblaciones de salmón del Atlántico en riesgo de presentar Vibriosis.

Los objetivos específicos son:

1. Establecer el porcentaje de mortalidad en el grupo de peces vacunados con la autovacuna *V. ordalii* (vacuna A).
2. Establecer el porcentaje de mortalidad en el grupo de peces vacunados con el producto bivalente *V. anguillarum* serotipo O2 α y virus IPN (vacuna B).
3. Determinar la eficiencia de la vacuna A y B en la reducción de la mortalidad provocada por bacterias del género *Vibrio* en comparación con la vacuna C (grupo control) mediante RPS.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Los materiales, instalaciones y productos en prueba de la investigación se describen a continuación:

1. Para el desarrollo de este estudio se consideró una población de 425.500 salmones del Atlántico (*S. salar*) de 120 g promedio, cepa FANAD nacional, ubicados en 3 balsas-jaulas cuadradas de 20 por 20 m de perímetro y 10 m de profundidad, que son parte de un módulo de 8 unidades (Anexo 2).
2. Vacuna A: Autovacuna inyectable preparada en base a *Vibrio ordalii*. Es una bacterina en una emulsión con coadyuvante.
3. Vacuna B: Vacuna bivalente inyectable preparada en base a *Vibrio anguillarum* serotipo O2 α que es una bacterina, y la porción recombinante, preparada con la proteína viral de superficie Vp2 del virus de la necrosis pancreática infecciosa. La vacuna es una emulsión con coadyuvante.
4. Vacuna C: Vacuna monovalente inyectable de tipo virina preparada en base a IPNV, es una vacuna en una emulsión con coadyuvante, utilizada como grupo control.
5. Los materiales de disección en terreno fueron: mechero, placas con los medios de cultivo (agar TSA adicionado con 1,5% NaCl, agar Marino y agar TCBS), bisturí, porta bisturí, pinzas, tijeras, papel absorbente, alcohol al 95%.

4.2 MÉTODOS

El ensayo fue realizado por 12 semanas post ingreso de los peces a la fase de engorda. Por el hecho de que los peces del grupo B ingresaron una semana después que los otros grupos, se analizó una semana más de este grupo (semana 13).

4.2.1 ORIGEN Y MANTENCIÓN DE LOS PECES

Los peces se recibieron vacunados por vía intraperitoneal (el proceso es detallado en el anexo 1), proceso que fue efectuado en el centro de agua estuarina donde luego esmoltificaron. La descripción de este manejo se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 1: Detalle de vacunación realizada en estuario con las 2 diferentes vacunas en estudio y la vacuna control en salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

Balsa-Jaula	Grupo	Vacuna	Peso promedio vacunación (g)	Dosis por pez	T° (°C) Vacunación	N° peces
103	Vacunado	A	26,1	0,05 ml	10,7	57.800
104	Vacunado	A	28,6	0,05 ml		61.547
106	Vacunado	A	27,6	0,05 ml		51.983
205	Vacunado	B	46,9	0,1 ml	11,9	48.099
206	Vacunado	B	45,5	0,1 ml		52.122
208	Vacunado	B	36,1	0,1 ml		59.008
117	Vacunado	C	30,4	0,1 ml	10,9	41.257
118	Vacunado	C	34,2	0,1 ml		49.198
405	Vacunado	C	41,2	0,1 ml		58.104

Los peces provinieron del centro Pucheguin, ubicado en el estuario Reloncaví, X Región de los Lagos. Los peces ya vacunados con las dos vacunas experimentales contra *Vibrio* y los peces vacunados contra IPN, fueron mantenidos en el centro de estuario durante el periodo necesario para que alcanzaran una adecuada producción de anticuerpos, para luego ser transportados por mar hasta el Centro Quinchao, Chiloé, X Región, Chile. Estos fueron trasladados vía mar en embarcaciones de transporte de peces (wellboats).

Los grupos de peces vacunados en estuario registraron unidades térmicas acumuladas (UTA) por sobre el recomendado por la empresa fabricante de la vacuna (Anexo 3). Para la vacuna A las UTA recomendadas son de 400, para la vacuna B son de 500 y para la vacuna C son de 600.

Tabla 2: Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) vacunados en el estuario.

Grupo	Vacuna	Días en estuario	UTA
Vacunado	A	97	1.140
Vacunado	B	52	677
Vacunado (Control)	C	105	1.231

Los 3 grupos de peces se distribuyeron de la siguiente manera, los peces inmunizados con la Vacuna A en la jaula 106 con 138.500 peces, provenientes de las jaulas 103, 104 y 106, la Vacuna B en la jaula 102 con 144.000 peces, provenientes de las jaulas 205, 206 y 208 y el Grupo control vacunado (Vacuna C) en la jaula 107, con 143.000 peces, provenientes de las jaulas 117, 118 y 405 (Tabla 3).

La alimentación de los peces consistió en una dieta seca comercial en una cantidad equivalente a la división entre el alimento consumido diariamente y la biomasa de peces de la balsa-jaula correspondiente, suministrado dos veces al día (AM y PM).

Tabla 3: Detalle de recepción de salmón del Atlántico vacunados en aguas estuarinas, al ingreso en agua de mar.

Balsa-Jaula	Vacuna	Peso promedio Ingreso (g)	Nº peces
106	A	135,6	138.500
102*	B	85,6	144.000
107	C	138,6	143.000

* Los peces del grupo vacuna B ingresaron la semana 2 del ensayo.

4.2.2 CONFIRMACIÓN DE LA MORTALIDAD POR *V. ordalii*

El desafío fue natural realizado en condiciones de producción por el hecho que estos peces no fueron inoculados con *V. ordalii*, durante 12 semanas post ingreso a agua de mar. Se analizó la mortalidad de las jaulas en cuestión y se clasificó por causa. Los peces muertos fueron retirados de las jaulas 2 veces por semana por el buzo y clasificada por la planilla de la empresa (Anexo 4).

Se realizaron muestreos aproximadamente cada 20 días de peces moribundos de las jaulas en estudio. Las muestras fueron analizadas como se detalla:

4.2.2.1 Estudio clínico y anatomopatológico

Cada pez muestreado (moribundo) fue examinado mediante inspección directa, describiendo macroscópicamente las alteraciones externas de la piel, aletas, ojos, branquias y cavidad bucal. Finalizado el examen externo de los peces, se procedió a realizar la necropsia de acuerdo al American Fisheries Society (1992) describiéndose las alteraciones internas macroscópicas.

4.2.2.2 Tinción de Gram

De cada ejemplar muestreado, se realizaron improntas de bazo y riñón, las cuales se fijaron con calor, para ser teñidas posteriormente con tinción de Gram. Luego fueron observadas con microscopio óptico aumento 100 x, para determinar la presencia de bacilos Gram negativos en dichos tejidos.

4.2.2.3 Siembra y cultivo bacteriano

Se tomaron muestras de riñón y bazo de cada pez examinado, las que fueron sembradas mediante estrías con un asa estéril en placas con Agar Soya Trypticase (TSA) 1,5% NaCl. Para las lesiones externas se utilizó placas con Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) para luego ser incubadas en una estufa a 22-23 °C por 48 a 72 h, para observar el desarrollo de colonias bacterianas con morfología similar a *V. ordalii*.

A partir de colonias aisladas con morfología similar a las de *V.ordalii*, se realizó un repicaje, en Agar TSA 1,5% NaCl, con el fin de obtener un cultivo puro y a partir de éste realizar sensibilidad al vibriostático 0/129 (Oxoid 114), novobiocina y pruebas bioquímicas.

4.2.2.4 Pruebas bioquímicas

A partir de colonias puras sospechosas de ser *Vibrio spp* se realizaron pruebas bioquímicas consistentes en analizar las características bioquímicas y biofísicas de las bacterias en cuestión, para llevar a una identificación certera del microorganismo.

4.2.3 CÁLCULO DEL PORCENTAJE RELATIVO DE SOBREVIVENCIA (RPS)

Con los datos de mortalidad de los peces vacunados con los productos A, B y C se determinó el Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS) para definir la eficiencia o potencia de las vacunas en este estudio de campo.

$$\text{RPS} = \left(1 - \frac{\% \text{ Mortalidad peces vacunados}}{\% \text{ Mortalidad peces control}} \right) \times 100$$

4.2.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados expresados en porcentaje de mortalidad acumulada, semanal y temperatura diaria, se presentan en tablas y gráficos.

5. RESULTADOS

Se presentan a continuación los resultados del estudio de campo en el que se evaluó la eficiencia de dos vacunas para la prevención de la Vibriosis. Este ensayo se desarrolló durante un periodo de 12 semanas post ingreso de los peces a la fase de engorda, durante el cual se presentó un cuadro clínico de Vibriosis. Se dio por concluido el ensayo cuando se detectaron los primeros hallazgos de signología clínica de una enfermedad distinta de Vibriosis, que fue respaldado por análisis de laboratorio realizados en ADL, Castro. En los análisis de laboratorio fue confirmada la mortalidad causada por *V. ordalii*, con propiedades bioquímicas descritas en el anexo 5.

5.1 MORTALIDADES

5.1.1 MORTALIDAD EN S. ATLÁNTICO VACUNADOS

En la tabla N° 4 se puede observar la mortalidad total semanal y acumulada ocurrida en los peces post ingreso a agua de mar, tanto en los grupos en ensayo (vacunados con el producto A y B) como en el grupo control (peces vacunado con el producto C).

Tabla N° 4: Mortalidad total semanal (S), acumulada (A) y porcentual acumulada (%) en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 110 a 505 g inmunizados con las vacunas en ensayo (A y B) y la vacuna control (C), entre diciembre de 2004 y febrero de 2005.

Semana	Grupos en Ensayo						Grupo Control		
	Vacuna A			Vacuna B			Vacuna C		
	S	A	%	S	A	%	S	A	%
1	1.103	1.103	0,80				968	968	0,68
2	750	1.853	1,34	110	110	0,08	1.208	2.176	1,52
3	1.175	3.028	2,19	576	686	0,48	1.187	3.363	2,35
4	590	3.618	2,61	412	1.098	0,76	1.286	4.649	3,25
5	1.382	5.000	3,61	1.249	2.347	1,63	1.279	5.928	4,15
6	740	5.740	4,14	467	2.814	1,95	403	6.331	4,43
7	893	6.633	4,79	319	3.133	2,18	418	6.749	4,72
8	315	6.948	5,02	655	3.788	2,63	163	6.912	4,83
9	277	7.225	5,22	741	4.529	3,15	114	7.026	4,91
10	277	7.502	5,42	1.649	6.178	4,29	111	7.137	4,99
11	197	7.699	5,56	992	7.170	4,98	76	7.213	5,04
12	229	7.928	5,72	1.407	8.577	5,96	104	7.317	5,12
13	-	-	-	915	9.492	6,59	-	-	-
Total	7.928		5,72	9.492		6,59	7.317		5,12

La mortalidad total experimentada por los peces de los grupos en ensayo fue de un 5,72% para el grupo A y 6,59% grupo B siendo superior a la de los peces del grupo control (5,12%).

La mortalidad total de los grupos ocurrida durante el período de estudio correspondió a 24.737 peces equivalente a un 5,81 % de los 425.500 ingresados a agua de mar. Dentro de esto la mortalidad total de los 3 grupos se clasificó en las siguientes causas: Micosis con un 0,08 % equivalente a 19 peces, “pinhead/stunt” con un 9,38 % equivalente a 2.322 peces, y Vibriosis con un 90,54% equivalente a 22.396 peces (Gráfico 1).

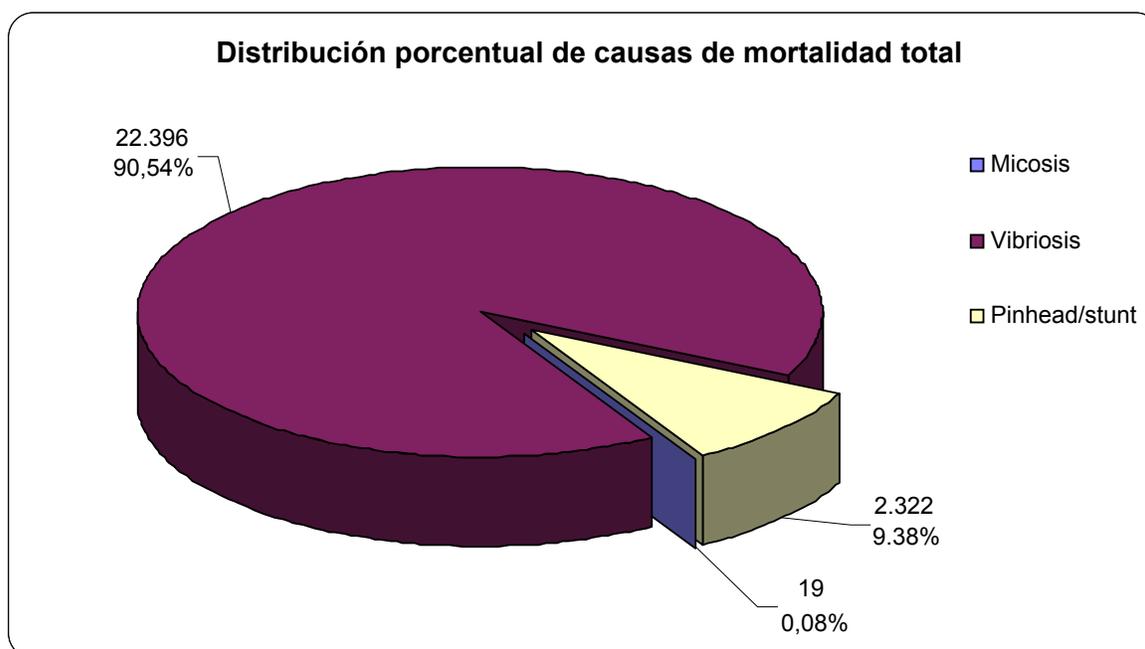


Gráfico 1: Distribución de las causas de mortalidad total de los 3 grupos en salmón del Atlántico en las 12 semanas correspondientes al ensayo.

En la mortalidad atribuible a Vibriosis de los grupos vacunados, se observó la misma tendencia de la mortalidad total, donde se registro un 4,62 % para el grupo inyectado con la vacuna A, de 6,24 % para el producto B y 5,12% para la vacuna C (control) (Tabla5).

Tabla N° 5: Mortalidad semanal (S), acumulada (A) y porcentual acumulada (%) atribuible a Vibriosis en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 110 a 505 g inmunizados con las vacunas en ensayo (A y B) y la vacuna control (C), entre diciembre de 2004 y febrero de 2005.

Semana	Grupos en Ensayo						Grupo Control		
	Vacuna A			Vacuna B			Vacuna C		
	S	A	%	S	A	%	S	A	%
1	1.765	1.765	1,27				968	968	0,68
2	750	2.515	1,82	110	110	0,08	1.208	2.176	1,52
3	1.175	3.690	2,66	576	686	0,48	1.187	3.363	2,35
4	590	4.280	3,09	412	1.098	0,76	1.286	4.649	3,25
5	601	4.881	3,52	1.249	2.347	1,63	1.279	5.928	4,15
6	367	5.248	3,79	467	2.814	1,95	403	6.331	4,43
7	619	5.867	4,24	319	3.133	2,18	418	6.749	4,72
8	135	6.002	4,33	637	3.770	2,62	163	6.912	4,83
9	105	6.107	4,41	741	4.511	3,13	114	7.026	4,91
10	128	6.235	4,50	1.649	6.160	4,28	111	7.137	4,99
11	63	6.298	4,55	992	7.152	4,97	76	7.213	5,04
12	99	6.397	4,62	1.047	8.199	5,69	104	7.317	5,12
13	-	-	-	785	8.984	6,24	-	-	-
Total	6.397		4,62	8.984		6,24	7.317		5,12

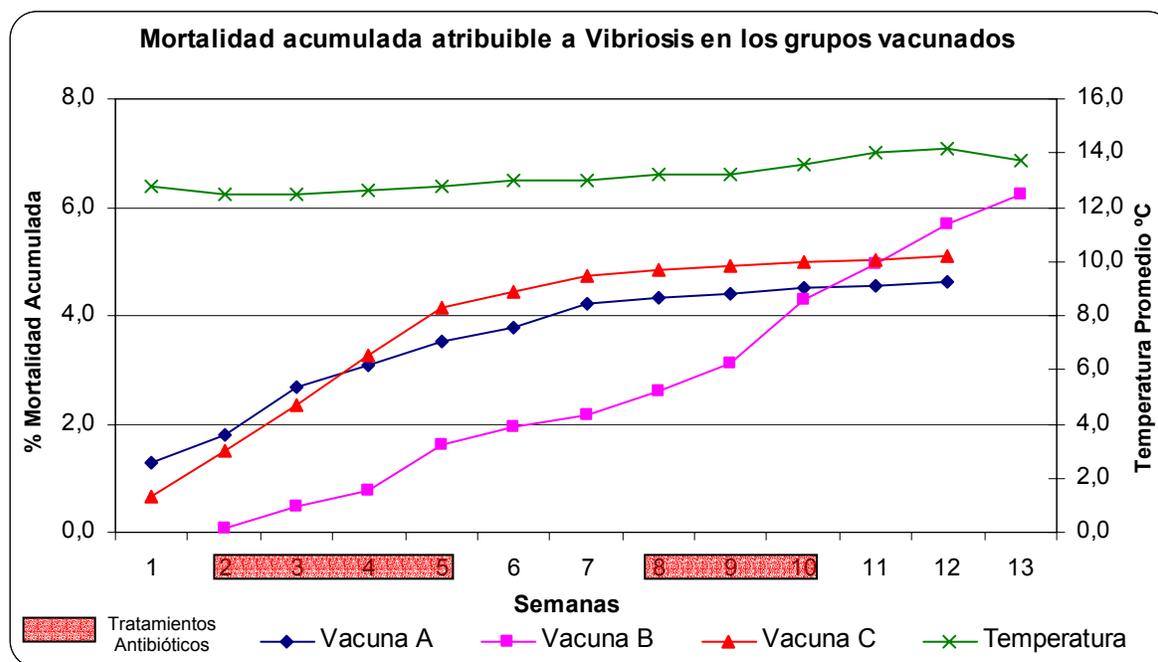


Gráfico 2: Evolución del porcentaje de mortalidad semanal acumulada atribuible a Vibriosis en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 110 a 505 g inmunizados con las vacunas en ensayo (A y B) y la vacuna control (C) y la temperatura del agua en el período.

Las semanas 2, 3, 4, 5 y 8, 9, 10 que se señalan marcadas en rectángulos rojos, son aquellas en que se realizaron tratamientos antibióticos orales a los 3 grupos en estudio, debido a mortalidades semanales mas altas que las establecidas para esta etapa de engorda. El primer tratamiento fue entregado desfasado para el grupo B con respecto al A y C, por el ingreso de los peces del grupo B al centro de engorda una semana después que los otros, por lo tanto el tratamiento terminó después (semana 5) que el grupo A y C. Los detalles de estos tratamientos se describen en el anexo 6.

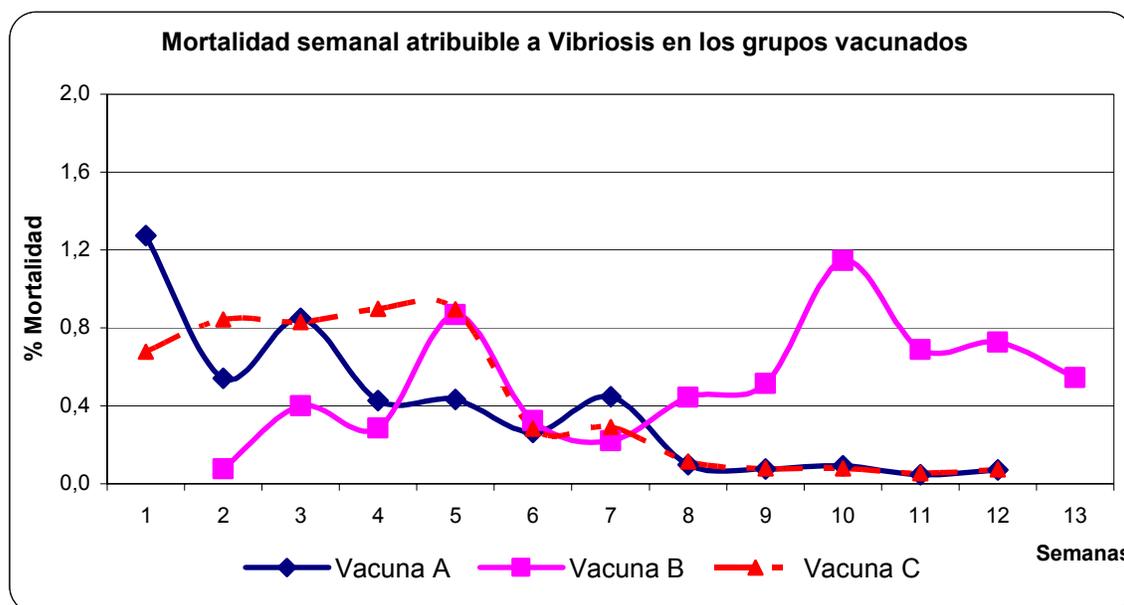


Gráfico 3: Porcentaje de mortalidad semanal, atribuible a Vibriosis, en salmón del Atlántico (*S. salar*) de 110 a 505 g vacunados con las vacunas en ensayo (A y B) y la vacuna control (C).

La vacuna B presentó 3 picos de mortalidad y luego del 1° pico la mortalidad semanal se mantuvo siempre superior al 0,22%. Por su parte la vacuna A presentó 2 picos de mortalidad y luego la mortalidad decreció sin aumentar del 0,1 %. El grupo C mantuvo mortalidades altas las primeras 6 semanas y luego mantuvo mortalidades bajo el 0,1% al igual que el grupo A.

5.1.2 Resultados del Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS)

A partir de los resultados de mortalidad presentados en la tabla N° 5 se calculó el porcentaje relativo de supervivencia de las vacunas A y B.

% Mortalidad peces vacunados con el producto A en agua salada: 4,62

% Mortalidad peces vacunados con el producto B en agua salada: 6,24

% Mortalidad peces vacunados con el producto C en agua salada: 5,12

$$\text{RPS Vacuna A: } \left(1 - \frac{4,62}{5,12} \right) \times 100 = 9,76 \%$$

$$\text{RPS Vacuna B: } \left(1 - \frac{6,24}{5,12} \right) \times 100 = -21,87 \%$$

6. DISCUSIÓN

Durante las 12 semanas de ensayo la mortalidad total de los 3 grupos de peces vacunados fue de 5,81 % de los 425.500 peces del total en ensayo. De esta mortalidad se registró un 90,54 % atribuido a Vibriosis (*V. ordalii*) y el porcentaje restante fueron peces “pinhead/stunt” (9,38 %), denominación que reciben los peces que no han completado el proceso de esmoltificación presentando un crecimiento deficiente (Clarke y Nogahama 1977) y Micosis (0,08 %).

La diferencia de la mortalidad total y específica de cada grupo fue atribuida a peces “pinhead/stunt” y representó 1,1 puntos porcentuales (1.512 peces) para el grupo inmunizado con la autovacuna (grupo A), y 0,35 puntos porcentuales (508 peces) para el grupo inmunizado con la vacuna bivalente (grupo B). Teniendo en cuenta que los peces del grupo A y B, pertenecían a tallas pequeñas de selecciones anteriores en el origen y que no fueron graduados por peso antes de ser transportados a la fase de engorda, fue esperable encontrar peces “pinhead/stunt” en la población de éstos grupos. El grupo C (peces controles) no presentó peces “pinhead/stunt”, debido a que éstos fueron eliminados en el estuario cuando el grupo fue seleccionado por peso antes de ser transportado a la fase de engorda.

Las vacunas con coadyuvantes oleosos, como las usadas en este ensayo, pueden producir como efecto secundario adherencias abdominales que predisponen a la aparición de peces “pinhead/stunt” y peces de menor condición corporal (Midtlyng y Lillehaug 1998), estos peces al derivar de un mal proceso de esmoltificación, presentan una baja condición nutricional y un sistema inmune limitado, comportándose como reservorios de enfermedades en situaciones de cuadros infecciosos. Además, son incapaces de competir por el alimento y por este motivo cuando se entrega una terapia oral (medicamento incorporado en el alimento) no la consumen y mantienen la enfermedad en la unidad de cultivo (Valenzuela 1999), condición que pudo influenciar la permanencia del agente y los brotes de mortalidad en los grupos A y B en el período en ensayo. La cantidad de peces “pinhead/stunt” eliminados durante la fase de agua estuarina, fue mayor en los grupos vacunados con la autovacuna y con la vacuna bivalente comparado con los peces vacunados con el producto control, según Midtlyng y Lillehaug (1998) los efectos negativos sobre el crecimiento de los peces vacunados con productos que contiene coadyuvantes oleosos, es debido a severas adherencias intraabdominales ocurridas luego de la vacunación. Al respecto un estudio de los 3 grupos realizado por la empresa posterior a las 12 semanas de ensayo, determinó que los peces del grupo inmunizado con la vacuna bivalente (vacuna B) presentó un mayor grado de adherencias con respecto a los otros 2 grupos en ensayo, esta condición pudo influenciar la mortalidad de los peces vacunados con el producto B.

El estrés provocado por el transporte, pudo influenciar las mortalidades que presentaron los peces durante los primeros días post-ingreso a la fase marina (Bravo 2005), y no necesariamente las mortalidades ocurridas posterior a la primera semana, ya que pueden asociarse en este caso a Vibriosis causada por *V. ordalii* que fue aislado de los peces enfermos, mortalidad que se mantuvo durante las 12 semanas que duró el ensayo.

El período de desarrollo de la inmunidad (PDI), es el tiempo necesario en unidades térmicas acumuladas (UTA) para producir una respuesta protectora, previo a la exposición con el agente, que consiste en el desarrollo de niveles protectivos de anticuerpos circulantes. Las tres vacunas utilizadas en este ensayo cumplieron con el PDI indicado por el laboratorio fabricante. El tiempo que pasaron los grupos del ensayo en el estuario fue de 97 días (1.140 UTA) para los peces del grupo vacuna A, 52 días (677 UTA) para el grupo vacuna B y 105 días (1.231 UTA) para el grupo vacuna C (grupo control). Como se indica en el anexo 3 los grupos vacuna A y C pasaron mucho más tiempo del que exige el PDI antes de ser transportados al agua de mar, lo que pudo condicionar una disminución en los niveles protectivos de la vacuna, pero los resultados no reflejaron esta situación. Adicionalmente las vacunas son formuladas para proteger a los peces por un año post aplicación.

La mortalidad atribuible a Vibriosis correspondió a un 4,62 % para el grupo de peces de la autovacuna *V. ordalii*, 6,24 % para los peces inmunizados con la vacuna bivalente *V. anguillarum* serotipo O2 α y virus IPN y 5,12 % para los peces controles vacunados con virina de virus IPN. Estos porcentajes coinciden con lo reportado por Godoy (2004), quien menciona mortalidades acumuladas de 5 % a 22 %, mientras que Colquhoun y col (2004) reportaron mortalidades de entre 0,65 - 0,82%/semana. Como indica el gráfico 3 la mortalidad acumulada específica por Vibriosis de la vacuna bivalente (*Vibrio anguillarum* serotipo O2 α y virus IPN) se comportó con menores mortalidades acumuladas hasta la décima semana del estudio, donde se produce un alza por sobre el grupo inoculado con la autovacuna *Vibrio ordalii* y el grupo control. Por su parte, la mortalidad del grupo inmunizado con la vacuna autógena (grupo A) fue mayor a la del grupo control solo las primeras 3 semanas, luego las mortalidades del grupo control se mantuvieron sobre el grupo de peces con la autovacuna hasta el término del estudio.

Las dos vacunas en ensayo no fueron capaces de disminuir la mortalidad por Vibriosis, respecto del grupo de peces control. El porcentaje de mortalidad acumulada del grupo inmunizado con la vacuna bivalente y control, fluctuó entre el 5 y 6 %, valores cercanos al menor porcentaje de mortalidad reportado por Godoy (2004) para la Vibriosis en Chile provocada por *V. ordalii*, lo que podría hacer presumir que el agente era de baja virulencia para estas poblaciones de salmón del Atlántico.

El grupo control registró mortalidades cercanas a los grupos en prueba, lo que influyó la evaluación de las vacunas en ensayo. Es necesario considerar dos situaciones, primero que quizás el grupo control tuvo contacto con *V. ordalii* previamente en el estuario (origen), desarrollando así inmunidad natural contra el patógeno y segundo, que la vacuna virus IPN por contener un coadyuvante en su formulación, estimuló la respuesta inmune en forma inespecífica confiriéndole a estos peces una suerte de protección contra *V. ordalii*. La elección del grupo control, fue debida a que la vacuna virus IPN en su formulación presenta un coadyuvante de tipo oleoso, del mismo tipo que el de las dos vacunas en prueba, permitiendo la comparación entre los productos en ensayo.

En el estuario se han reportando brotes de *Vibrio ordalii* (Godoy 2004), *Streptococcus phocae* y *Piscirickettsia salmonis* (Bravo y Campos 1989, Fryer y col 1990, Bransom y Nieto 1991, Cvitanich y col 1991). El hecho que los peces hayan permanecido el período de esmoltificación durante la temporada estival y que hayan tenido contacto con el patógeno antes o durante el manejo de vacunación, pudo condicionar una incompleta respuesta de inmunidad contra el patógeno.

Como las tres vacunas utilizadas en el ensayo contienen coadyuvantes, se estimuló tanto la respuesta inmune inespecífica como la específica. El sistema inmune específico está basado en una serie de cambios adaptativos que tienen lugar dentro de las poblaciones linfoides (linfocitos T y B), dirigidos hacia la estructura molecular que provocó su estímulo (Ruiz y col 2003). Esta respuesta se divide en una respuesta de tipo humoral, mediada por anticuerpos y celular mediada por linfocitos T (Ellis 1988b). Debido a que *Vibrio spp.* es un organismo Gram negativo, la bacteria completa además conferiría un efecto de coadyuvante no específico, estimulando la respuesta inmune del pez que contrarrestaría desafíos contra otros organismos. En general las bacterinas son antígenos que estimulan directamente los linfocitos B (Smith 1988).

La inmunidad inespecífica comprende una serie de mecanismos, en los que están implicados componentes humorales como complemento, lisozimas, interferón, transferrinas, la proteína C-reactiva, componentes celulares como los macrófagos y los mecanismos de la inflamación (Dalmo y col 1997). Esta última respuesta fue estimulada tanto por la porción bacterina de la vacuna como por el coadyuvante oleoso (Ellis 1988a). El coadyuvante por su formulación oleosa cumple la función adicional de liberar en el pez el antígeno de manera prolongada en el tiempo (Folch y col 2000).

Los LPS son considerados como los mayores antígenos protectivos de la pared celular de bacterias del genero *Vibrio*. A partir de análisis químicos de los LPS (lipopolisacáridos) de ambas bacterias, se encontraron diferencias en el total cuantitativo de residuos específicos de

carbohidratos y en los residuos lipídicos en los LPS purificados (Salati y Kusuda 1986). Al parecer en los LPS de las bacterias antes mencionadas, existirían dos tipos de epítopes o determinantes antigénicos, los que son cepa específicos y aquellos que reaccionan cruzadamente (Mutharia y col 1993). Esta evidencia indicaría que la molécula LPS no tiene propiedades antigénicas idénticas para ambas bacterias y sugeriría que tiene que existir otro antígeno diferente que contribuya a la completa protección entre las cepas de *V. ordalii* y *V. anguillarum* serotipo O2 (Mutharia y col 1993, Mutharia y Amor 1994). En el estudio realizado por Mutharia y Amor (1994) queda claro que las bacterinas preparadas en base a *V. ordalii* no producen inmunidad completa contra *V. anguillarum* O2 (incluyendo O2 α), sin embargo, anticuerpos policlonales producidos de antígenos comunes de los serotipos O2 de bacterinas preparadas a partir de *V. ordalii*, protegerían al pez contra un desafío menor de tipos de *Vibrio anguillarum* O2 y O2 α . Esto explicaría el porque la autovacuna *Vibrio ordalii* tuvo las menores mortalidades (4,6 %) en el período de desafío provocado por *Vibrio ordalii*, ya que peces vacunados son protegidos con preparaciones que contienen LPS de bacterinas de serotipos homólogos (Mutharia y col 1993, Mutharia y Amor 1994).

Como principio general en el desarrollo y prueba de vacunas, los ensayos de laboratorio siempre deben ser acompañados de pruebas de campo, por el hecho de que la eficiencia de la vacuna demostrada en condiciones de laboratorio puede no ser la misma (Mitchell 1997). Ensayo de campo se define como una investigación científica de un producto determinado, bajo las condiciones de campo de los animales objetivo, usando el producto según las recomendaciones del fabricante (EMEA 2001). Es por esto que en el presente ensayo se analizó la repuesta de dos vacunas contra Vibriosis, una vacuna autógena preparada a partir de *Vibrio ordalii* y una vacuna bivalente comercial preparada a partir de *Vibrio anguillarum* serotipo O2 α y virus IPN, apoyándose en la reacción cruzada que existe entre estas dos bacterias (Chart y Trust 1984, Mutharia y col 1993).

Dentro de las ventajas de los ensayos de campo se describe que son una valiosa herramienta para los productores y profesionales de salud animal, para determinar el funcionamiento y seguridad de los productos vaccinales en sus propias instalaciones de producción. Por su parte las desventajas residen en que para el desarrollo de estas pruebas se necesita de consecuencia y predictibilidad de los factores involucrados y las condiciones de campo son a menudo contrarias a esto (Mitchell 1997). También idealmente en estos ensayos de pruebas de potencia y efectividad de vacunas, no se debería realizar ningún tipo de tratamiento antibiótico ni manejo que pueda influir en el real resultado de las vacunas, hecho que no ocurrió en el presente estudio.

Durante el período de ensayo se produjeron mortalidades en los tres grupos de peces en prueba por sobre las estipuladas por la empresa como normales dentro de la fase de engorda, por lo tanto se procedió a efectuar dos terapias antibióticas de 15 días de duración cada una con florfenicol y flumequina, respectivamente. El primer tratamiento fue entregado

aproximadamente una semana después que fueron ingresados los peces al centro de mar, por lo tanto el grupo A (autovacuna *Vibrio ordalii*) y C (vacuna virus IPN) recibieron el alimento medicado entre las semanas 2 y 4 y el grupo B (vacuna bivalente *V. anguillarum* serotipo O2 α) entre las semanas 3 y 5. El segundo tratamiento se efectuó al mismo tiempo para los 3 grupos y se entregó a partir de la semana 8 a la 10. El manejo de vacunación tiene como fin evitar la presentación de la enfermedad y disminuir la mortalidad en las poblaciones de peces. Al realizar tratamientos antibióticos durante el período de desafío de las vacunas se produce un efecto de enmascaramiento del real funcionamiento de las vacunas, por el hecho de que el tratamiento antibiótico también tiene como efecto disminuir la mortalidad de los peces. En consecuencia las terapias antibióticas dificultaron el análisis y la interpretación de las mortalidades de los peces y claramente fueron un indicador de la deficiencia de las vacunas a la hora de prevenir un brote de Vibriosis. El hecho que los ensayos de campo estén más expuestos a variaciones y modificaciones en su modelo original, es una de los puntos que hace difícil su análisis, por lo tanto se hace necesario estandarizar protocolos y metodologías para la evaluación de campo de fármacos y vacunas.

Es oportuno mencionar que sobre la evaluación de los resultados de vacunas para la Vibriosis en salmón del Atlántico en ensayos de campo, existe escasa información publicada. La información disponible es sobre ensayos analizando la eficiencia y potencia de vacunas contra otras enfermedades en estudios de tipo experimental.

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

- RPS < 70 = Vacunación Deficiente.
- RPS > 70 = Vacunación Suficiente.
- RPS > 80 = Vacunación Exitosa.

Según esta categoría tanto el RPS para la vacuna A (9,76 %) como para la vacuna B (-21,87%) serían vacunas deficientes.

Es necesario mencionar que el RPS utilizado en pruebas de campo es una modificación a las bases descritas por Ellis (1988a), ya que no cumple con todas ellas. En condiciones de campo las mortalidades inespecíficas pueden superar el 10%, la mortalidad de los grupos controles no siempre alcanza el 60% en el período de desafío y el porcentaje de mortalidad de los grupos vacunados no siempre es inferior al 24% en el período de ensayo ya que puede estar influenciada por otras causas de mortalidad.

CONCLUSIONES

- La mortalidad específica por *Vibrio ordalii* del grupo inmunizado con la autovacuna *V. ordalii* (Vacuna A) fue de 4,62%.
- La mortalidad específica por *Vibrio ordalii* del grupo inmunizado con la vacuna bivalente *V. anguillarum* serotipo O2 α y virus IPN (Vacuna B) fue de 6,24%.
- El RPS para la autovacuna *Vibrio ordalii* fue de 9,76%, porcentaje que se considera como deficiente. El RPS de la vacuna bivalente *Vibrio anguillarum* serotipo O2 α e IPNV fue de -21,97% y se clasificó como deficiente. La mortalidad del grupo control fue de 5,12%.
- Aun cuando se pudo determinar los porcentajes de mortalidad y calcular el RPS de los grupos de peces vacunados, estos resultados están influenciados por las terapias antibióticas aplicadas, que de por si demostraron la ineficiencia de las dos vacunas en ensayo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. 1999. Fish Diseases and Disorders, Volumen 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Eds. P.T.K Woo and Bruno. Estados Unidos.

American Fisheries Society. Fish Health Section, Fish Health Blue Book. 1992. Procedimientos para la detección e identificación de ciertos patógenos de los peces. Traductor Alejandro E. Del Valle. Capítulo 16. Versión en español editada por Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA). Argentina.

Aqua. 2006. Estadísticas. *Aquanoticias* 102, 70-73.

Austin B, Austin DA. 1999. Bacterial fish pathogens: Diseases in Farmed and Wild fish. Third edition. Ed. Praxis. Cornwall, Inglaterra.

Bagge J, Bagge O. 1956. *Vibrio anguillarum* som arsak til ulcusygdom hos torsk (*Gadus callaris*). *Nordisk veterinarmedicin* 8, 481-492.

Baumann P, Furnis AL, Lee JV. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore-London.

Bergman AM. 1909. Die rote Beulénkrankheit des Aals. *Bericht aus der Königlichen Bayerischen Versuchsstation* 2, 10-54.

Branson EJ, Nieto D. 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America, *J Fish Dis* 14, 147-156.

Bravo S, Campos M. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. *FHS/AFS Newsletter* 17: 3.

Bravo S. 2005. Welfare en la producción de peces. *Versión diferente* 2, 10-13.

Carvajal J, González L, Teuber C, Gebauer M, Poblete T, Riffarty G, Donoso T. 1989. Patologías observadas durante 1989 en salmonideos en cultivo en la X Región. IX Jornadas de Ciencias del Mar. Antofagasta, Octubre 1989.

Carvajal P. 2000. Industria creciente, vacunas para la salmonicultura. *Salmonoticias* 83, 11-15.

Chart H, Trust TJ. 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Can J Microbiol* 30, 703-710.

Clarke NC, Nogahama Y. 1977. Effect of premature transfer to sea water on growth and morphology of pituitary, thyroid, pancreas and interrenal in juvenile coho salmon (*O. kisutch*). *Can J Zool* 55, 544-551

Colquhoun DJ, Aase IL, Wallace C, Baklien A, Gravningen K. 2004. First description of *Vibrio ordalii* from Chile. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 24, 185-188.

Cvitanich JD, Gárate O, Smith CE. 1991. The isolation of a Rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate, *J Fish Dis* 14, 121-145.

Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bøgwald J. 1997. Non-specific mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis* 20, 241-273

Egidius E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A Review. *Aquaculture* 67: 15-28.

Ellis A. 1988a. Optimizing Factors for Fish Vaccination. *Fish Vaccination* 3, 32-46.

Ellis A. 1988b. Ontogeny of the immune system in teleost fish. En: Ellis, A.E. (Ed.). *Fish Vaccination*, Acad. Press London. 20-31.

Emea. 2001. Field trials for veterinary vaccines. EMEA/CVMP/852/99-FINAL. Pp 8.

Folch H, Esquivel P, Astorquiza M, Barría M, Leyán V. 2000. Fundamentos generales de la inmunología. Universidad Austral. Valdivia, Chile.

Fryer J, Lannan CN, Garcés L, Larenas JJ, Smith PA. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol* 25, 107–114.

Godoy M. 2004. Salmónidos afectados por Vibriosis en Chile. *Aquanoticias* 91, 88-91.

Harrell LW. 1978. Vibriosis and current vaccination procedures in Puget Sound, Washington. *Fish Bull* 74, 447-449.

Inglis V, Bromage NR, Roberts RJ. 1993. Bacterial disease of fish. Chapter 6. Ed. New York: Institute of Aquaculture. Halsted Press, New York, Estados Unidos.

Kinkelin P, Michel C, Ghittino P. 1985. Tratado de las enfermedades de los peces. Ed. Acribia. Zaragoza, España

Lozano M. 2000. Compendio de la acuicultura y la pesca en Chile. Ed. *Aquanoticias*, Santiago, Chile.

Mattheis T. 1964. Das Vorkommen von *Vibrio anguillarum* in Ostseefischen. *Zentralblatt für Fischerei N F* 7, 259-263.

Midtlyng PJ, Lillehaug A. 1998. Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis Aquat Org* 32, 91–97.

Mitchell H. 1997. The pitfalls of field trials in fish vaccinology. *Developments in Biological Standardization* 90, 321-332.

Muñoz JC. 1990. Examen microbiológico en salmonideos de cultivo de la X Región para el intento de aislamiento de *Vibrio* sp. y otros agentes bacterianos. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.

Muroga K, Iida M, Matsumoto H, Nakai T. 1986. Detection of *Vibrio anguillarum* from water. *Bull Jap Soc Sc Fish* 52, 641-647.

Mutharia LW, Raymon TB, Dekievit TR, Stevenson RH. 1993. Antibody specificities of polyclonal rabbit and rainbow trout antisera against *Vibrio ordalii* and serotype 0:2 strains of *Vibrio anguillarum*. *Can J Microbiol* 39, 492-499.

Mutharia LM, Amor PA. 1994. Monoclonal antibodies against *Vibrio anguillarum* O2 and *Vibrio ordalii* identify antigenic differences in lipopolysaccharide O-antigens. *FEMS Microbiol Lett* 123, 289-298.

Nordmo R. 1997. Strengths and Weaknesses of Different Challenge Methods. *Dev Biol Stand* 90, 303-309.

Novotny AJ, Harrell LW. 1975. Vibriosis a common disease of Pacific salmon cultured in marine waters of Washington. College of Agriculture, Washington State University, *Extension Bulletin*, 663-668.

Oppenheimer CH. 1962. Marine fish diseases. En: Fish as Food, Vol. 2. New York, Academic Press. 541-572.

Paredes MS. 2005. Inoculación experimental a través de cuatro vías de *Vibrio ordalii* aislado en Chile en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Plumb JA. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University. USA.

Post G. 1983. Textbook of fish Health. TFH Publications. New Jersey, USA.

Roberts RJ. 1981. Patología de los peces. Ed. Mundi- Prensa. Madrid, España.

Roberts RJ. 2001. Fish Pathology- The Bacteriology of Teleosts. Ed. Baillière Tindall 3rd edition, London, England.

Rucker RR. 1963. Status of fish diseases and relation to production. *Report of the Second Governor's Conference on Pacific Salmon*, Seattle, January 1963. Pp 98-101.

Ruiz I, Fernández A, de Blas I. 2003. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *Revista Aquatic* 18, 33-38

Salati F, Kusuda R. 1986. Chemical composition of the lipopolysaccharides from *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Fish Pathol* 21, 193-199.

Schiewe MH, Trevor JT, Crosa JH. 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a Causative Agent of Vibriosis. *Fish Curr Microbiol* 6, 343-348.

Smith PD. 1988. Vaccination against Vibriosis. En: Ellis, A.E. (Ed.). *Fish Vaccination*, Acad. Press London. 67-81.

Tizard IR. 2004. *Veterinary Immunology: An introduction*. 7th edition. Saunders Company. Philadelphia. USA.

Toranzo AE, Barja JL. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aquat Org* 9, 73-82.

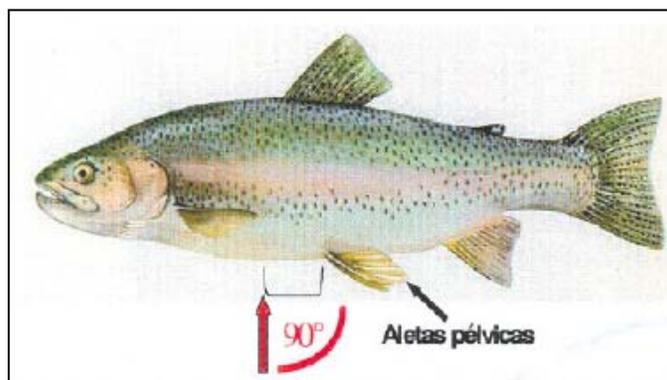
Valenzuela CE. 1999. Evaluación de la mortalidad en salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) durante los primeros seis meses en la fase de engorda. *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

West PA, Lee JV. 1982. Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae*, in natural waters of Kent, England. *J App Bacteriol* 52, 435-448.

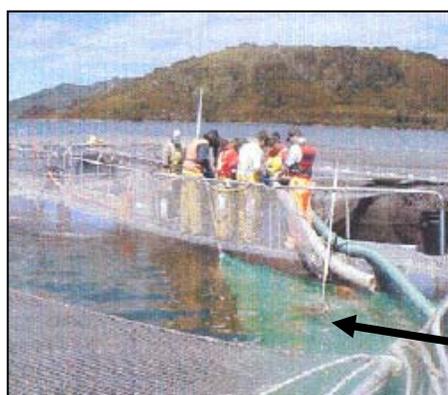
8. ANEXOS

Anexo 1: Manejo de vacunación de peces por vía inyectable.

1. Ayuno de los peces a vacunar por 48 h.
2. Sedación utilizando Benzocaína en dosis de 80 a 120 mg por litro de agua.
3. Traspaso de los peces a la mesa de vacunación (entre 130 y 180 peces con 6 a 8 personas por mesa).
4. Inyección intraperitoneal de la vacuna (el punto de inyección se ubicó un largo de aleta por delante de las aletas pélvicas, en la línea media ventral del pez, con un ángulo de inyección de 90° respecto del vientre del pez).



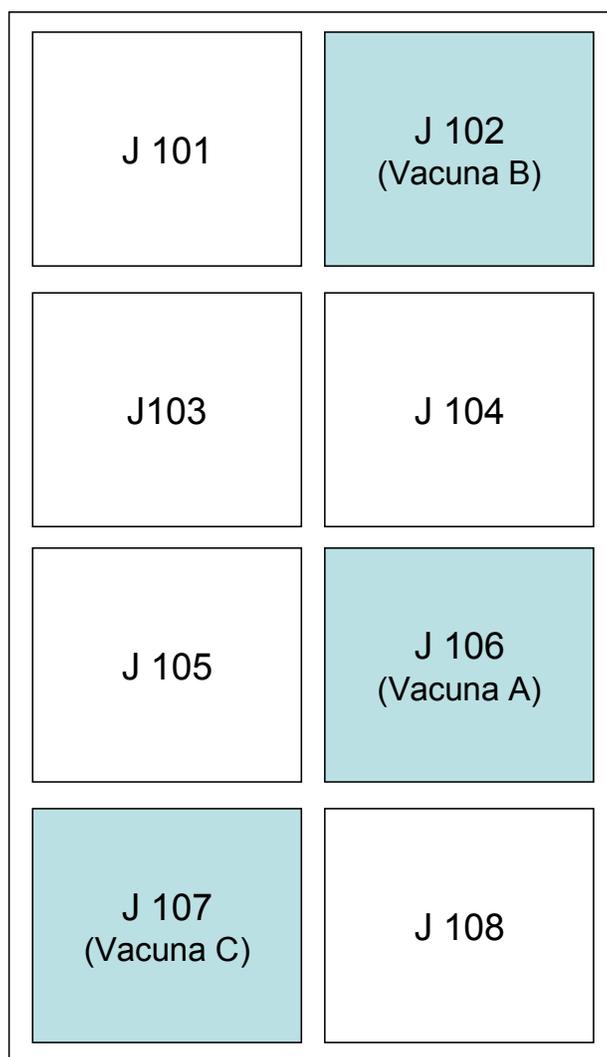
5. El manejo post inyección consistió en la recuperación del proceso anestésico (en lona de recuperación).



Lona de recuperación

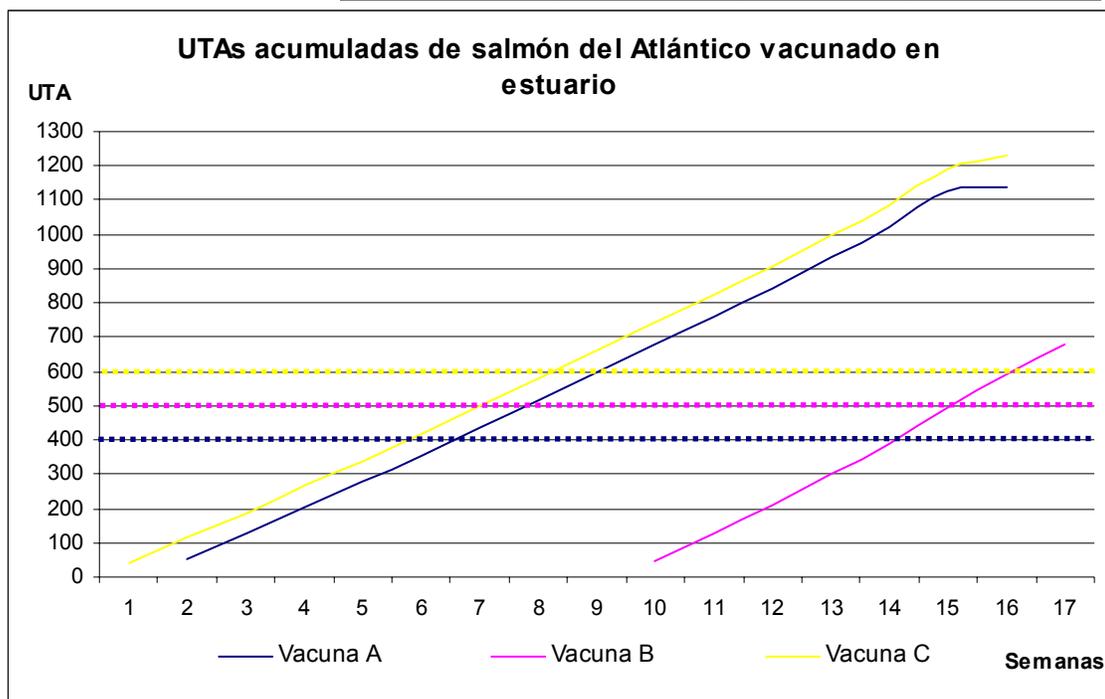
6. Posterior a la recuperación de los peces se entregó la alimentación al día siguiente de la vacunación.

Anexo 2: Ubicación de balsas-jaulas en estudio, dentro del centro de cultivo.



Anexo 3: Temperatura y Unidades Térmicas acumuladas (UTA) registradas en el estuario.

Semana	Fecha	T° Sem. (°C)	UTA Acumuladas		
			Vac. A	Vac. B	Vac. C
1	22-ago	10,5	-	-	41,9
2	29-ago	10,7	53,3	-	116,5
3	5-sep	10,3	125,3	-	188,5
4	12-sep	10,8	201,0	-	264,2
5	19-sep	10,7	275,8	-	339,0
6	26-sep	11,1	353,6	-	416,8
7	3-oct	11,6	434,8	-	498,0
8	10-oct	11,6	516,0	-	579,2
9	17-oct	11,6	597,2	-	660,4
10	24-oct	11,7	679,0	46,7	742,2
11	31-oct	11,7	761,1	128,8	824,3
12	7-nov	11,8	843,7	211,4	906,9
13	14-nov	12,7	932,6	300,4	995,8
14	21-nov	12,9	1.023,0	390,8	1.086,2
15	28-nov	14,8	1.126,5	494,3	1.189,7
16	5-dic	13,8	1.140,3	590,6	1.231,0
17	12-dic	14,4	-	677,2	-
TOTAL			1.140,3	677,2	1.231,0



Anexo 5: Propiedades bioquímicas de aislados de muestras extraídas de peces en ensayo.

Catalasa	+
Oxidasa	+
Motilidad	+
O/F	F
Indol	-
Voges Proskauer	-
Citrato	-
Sacarosa	-
Lactosa	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Trehalosa	-
Arabinosa	-
Ramnosa	-
Xilosa	-
Manitol	-
Celobiosa	-
Salicina	-
Glucosa (gas)	-
Lisina	-
Ornitina	-
Arginina	-
ONPG	-
Gelatinasa	-
Amilasa	-
Nitrato	+
Fluorescencia	-
0% sal	-
6% sal	+
8% sal	-
O/129	S
Novobiocina	S

Anexo 6: Tratamientos antibióticos orales realizados en *Salmo salar* en agua de mar, en los grupos vacunados en ensayo y control.

Fármaco	Dosis (mg/kg/día)	Duración (días)	Peso prom. grupo (g)
Florfenicol	17	15	112
Flumequina	30	15	186

9. AGRADECIMIENTOS

- M.V. Miguel Jarpa Gerente Técnico de la empresa Fjord Seafood S.A. por su apoyo y su interés en esta memoria de título.
- M.V. Gonzalo Palma y M.V. Manuel Salas por la ayuda y conocimientos entregados durante el desarrollo de este trabajo.
- Al Dr. Ricardo Enríquez, Sra. Mónica Monrás, M.V. Vania Quinteros, Sr. Esteban Henríquez, por la ayuda y consejo oportuno.
- A mis Padres y hermanos por su apoyo incondicional y sabios consejos.
- A mi Abuela Matilde por su cariño.
- Especialmente a Marcela por su apoyo, cariño y comprensión durante este proceso.