



**FIP 2014 - 61**

**“ESTUDIO EN EPIDEMIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA ENFERMEDADES EXÓTICAS O EMERGENTES CON ÉNFASIS EN *PISCINE REOVIRUS* (PRV) Y *RENIBACTERIUM SALMONINARUM* (BKD)”**

**INFORME FINAL**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Personal participante .....	8
Resumen ejecutivo .....	10
Abstract.....	16
Objetivo General .....	20
Objetivos Específicos .....	20
Introducción .....	21
Referencias.....	24
Metodología de trabajo .....	25
Actividad: Estudio oficial de diagnóstico, investigación de casos de enfermedades de etiología desconocida o emergente en especies de cultivo, ornamentales y silvestres.....	25
Actividad: Toma de muestras para PCR-PRV e histología .....	25
Actividad: Análisis de Laboratorio .....	28
Actividad: Homogenización de tejidos de peces para extracción de ácidos nucleicos (I-MOL-01) .....	28
Actividad: Extracción de ARN total (RNA Total Kit EZNA) (I-MOL-02).....	28
Actividad: Amplificación por RT-PCR en tiempo real para reovirus (HSMI) (I-MOL-23).....	28
Actividad: Amplificación por RT-PCR tiempo real factor de elongación 1 $\alpha$ (I-MOL-10).....	28
Actividad: Ligación y clonamiento de productos de PCR para secuenciación .....	29
Actividad: Definición de caso para HSMI.....	29
Actividad: Implementación de RT PCR para ASCV .....	29
Actividad: Implementación de PCR para <i>Renibacterium salmoninarum</i> .....	29
Actividad: Estudio epidemiológico de PRV/HSMI .....	29
Actividad: Toma de muestras para PCR-ASCV e histología.....	29
Resultados Objetivo 1 .....	32
Objetivo específico 1: Realizar investigación de casos de enfermedades de etiología desconocida o emergente en especies de cultivo y ornamentales, a solicitud de la Autoridad sectorial.....	32
1.1 Resultados de caso de alza de mortalidad en salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ) de cultivo, investigación oficial.....	32
1.2 Resultados de casos de alza de mortalidad en trucha arco iris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) de cultivo en fase marina. ....	36
1.3 Resultados de la detección de PRV en salmónidos silvestres.....	36
1.4 Resultados de casos sospechosos de SAV (Alfavirus de salmónidos) en trucha arcoíris en fase de agua dulce.....	40
1.5 Resultados de muestras de Trucha arco iris ( <i>O. mykiss</i> ) sospechosas de NGD (Enfermedad Nodular Branquial).....	42

1.6 Resultados de la prevalencia de ASCV (Calicivirus de salmón del Atlántico) en salmón del Atlántico en fase de agua dulce.....	42
<b>Conclusiones según Objetivo específico 1 .....</b>	<b>43</b>
Referencias.....	43
<b>Objetivo específico 2a: Estudio epidemiológico de Piscine Reovirus/HSMI, en reproductores y alevines, presmolts y smolts de salmón del Atlántico. ....</b>	<b>45</b>
2.a.1 Antecedentes de Piscine Orthoreovirus (PRV) .....	45
2.a.2 Etiología .....	45
2.a.3 Patogenia .....	46
2.a.4 Prevalencia de <i>Piscine reovirus</i> (PRV) en salmón del Atlántico.....	47
Prevalencia de PRV en Alevines, pre-smolts y smolts de salmón del Atlántico.....	47
Prevalencia de PRV en reproductores de salmón del Atlántico.....	50
<b>Estudio epidemiológico: determinación de factores de riesgo y protectivos asociados a la infección por Piscine reovirus (PRV) en salmón del Atlántico en la fase de cultivo de agua dulce.....</b>	<b>53</b>
Análisis de factores de riesgo asociados a la infección por PRV.....	53
<b>Resultados.....</b>	<b>54</b>
Estudio epidemiológico de Piscine Reovirus (HSMI), en el territorio nacional.....	54
Prevalencia de PRV en reproductores.....	54
Prevalencia de PRV en alevines, pre-smolts y smolts de salmón del Atlántico.....	54
Factores de riesgo asociados a la infección por PRV en alevines, presmolts y smolts. ....	57
<b>Conclusiones del estudio epidemiológico de PRV.....</b>	<b>59</b>
<b>Objetivo específico 2b: Estudio de la coinfección IPN-PRV-CLV en reproductores y juveniles – smolts de salmón del Atlántico. ....</b>	<b>62</b>
Antecedentes .....	62
Metodología.....	62
Resultados.....	63
Discusión .....	66
Conclusiones .....	69
Referencias.....	69
<b>Objetivo específico 3: Implementar y validar la técnica de inmunohistoquímica para piscine reovirus prv/hsmi.....</b>	<b>71</b>
Antecedentes de la descripción histopatológica de HSMI .....	71
3.1.1. Corazón: .....	71
3.1.2. Músculo esquelético:.....	71
3.1.3. Hígado:.....	71
3.1.4. Riñón:.....	71
3.1.5. Bazo: .....	71
3.1.6. Branquias: .....	71
3.1.7. Diagnósticos histológicos morfológicos:.....	73

<b>3.2. Implementación de Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de PRV y diagnóstico de HSMI en órganos.</b> .....	<b>73</b>
3.2.1. Protocolo – Anticuerpo Dr. Oystein Finstad: .....	73
3.2.2. Protocolo – Anticuerpo Dr. Marco Rozas: .....	74
<b>3.3. Conclusión</b> .....	<b>76</b>
<b>Objetivo específico 4: Estandarización y validación del método de diagnóstico para el patógeno <i>Renibacterium salmoninarum</i></b> .....	<b>79</b>
<b>4.1. Metodología</b> .....	<b>79</b>
4.1.1. Amplificación por PCR gen 16S rRNA de <i>R. salmoninarum</i> .....	79
4.1.2. Secuenciación del gen 16S rRNA de <i>R. salmoninarum</i> .....	79
4.1.3. Análisis filogenético .....	79
4.1.4. Determinación de unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL).....	80
4.1.5. Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT) para BKD .....	80
4.1.6. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR) .....	82
4.1.7. Real time PCR (qPCR).....	83
<b>4.2. Resultado de las encuestas aplicadas a los Laboratorios de la Red de SERNAPESCA</b> .....	<b>85</b>
<b>4.3. Resultado de la búsqueda de proveedores de Kit Diagnósticos detección <i>Renibacterium salmoninarum</i> por inmunofluorescencia</b> .....	<b>85</b>
<b>4.4. Resultado del análisis filogenético de cepas de <i>Renibacterium salmoninarum</i></b> .....	<b>86</b>
<b>4.5. Resultados de IFAT-BKD</b> .....	<b>88</b>
<b>4.6. Resultados de PCR anidado para BKD (nPCR-BKD)</b> .....	<b>88</b>
<b>4.7. Resultados de PCR tiempo real para BKD (qPCR-BKD)</b> .....	<b>89</b>
<b>4.8. Comparación de resultados IFAT-BKD, nPCR-BKD y qPCR-BKD</b> .....	<b>89</b>
<b>4.9. Conclusión</b> .....	<b>90</b>
<b>Objetivo específico 5: Realizar un estudio epidemiológico que dé cuenta de la situación actual de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (<i>Renibacterium salmoninarum</i>) en el territorio nacional.</b> .....	<b>91</b>
<b>5.1. Determinación de la prevalencia de BKD a nivel de centros productores de alevines - smolts y de reproductores</b> .....	<b>91</b>
5.1.1. Determinación de la prevalencia.....	91
<b>5.2. Determinación de factores de riesgo y protectivos asociados a la infección por <i>Renibacterium salmoninarum</i> (BKD) en reproductores de salmón del Atlántico</b> .....	<b>92</b>
<b>5.3. Resultados de la prevalencia de BKD en reproductores</b> .....	<b>92</b>
<b>5.4. Resultados de prevalencia de BKD en centros de s. Atlántico en etapa de producción de alevines a smolts.</b> .....	<b>94</b>
<b>5.5. Conclusiones</b> .....	<b>95</b>
<b>Objetivo específico 6: Ring Test en la detección de <i>Renibacterium salmoninarum</i> por los Laboratorios de Diagnóstico de la Red</b> .....	<b>96</b>
<b>6.1. Laboratorios participantes</b> .....	<b>96</b>
<b>6.2. Composición de las muestras</b> .....	<b>96</b>

6.3. Resultados .....	97
6.4. Discusión .....	102
<b>Publicaciones.....</b>	<b>103</b>
Resúmenes de Congreso.....	103
Revista Versión Diferente, 2° semestre 2017.....	108
<b>Encuestas HSMI/BKD fase de agua dulce y de mar. ....</b>	<b>109</b>
Resultados.....	109
Diseño de encuestas.....	109
<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>
Anexo 1: Reuniones de coordinación y avance.....	117
Anexo 2: Programa de capacitación de profesionales perteneciente a la Autoridad sectorial en enfermedades emergentes, sindrómicas y exóticas. ....	122
Anexo 3: Taller de divulgación de Resultados.....	124
Anexo 4: Curriculum <i>Vitae</i> .....	126
Anexo 5: Plan de trabajo .....	132
Anexo 6: Centro Capera y seguimiento.....	133
Anexo 7: CASOS SOSPECHOSOS DE SIT (Truchas) .....	146
Anexo 8: PRV salmónidos silvestres .....	158
Anexo 9: Informes de casos 03/16, 05/16, 11/16 y 17/16 .....	170
Anexo 10: Informe de casos 29/16, 32/16, 40/16, 03/17, 11/17 y 14/17 .....	186
Anexo 11: Casos Sospechosos de SAV .....	210
Anexo 12: Casos Branquias NGD Trucha.....	239
Anexo 13: Casos PRV AGUA DULCE .....	248
Anexo 14: PRV salmónidos silvestres .....	282
Anexo 15: Encuestas Técnicas BKD .....	294

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Personal participante.....	8
Tabla 1.2. Estadío de salmones del Atlántico (PRV).....	26
Tabla 1.3. Identificación de las muestras analizadas mediante examen histopatológico...	27
Tabla 1.4. Número de casos según estadios de salmón del Atlántico (ASCV).....	31
Tabla 1.5. Valores de parámetros sanguíneos de salmón del Atlántico.....	32
Tabla 1.6. Valores de parámetros sanguíneos (fórmula diferencial).....	33
Tabla 1.7. Rango y valores de CT qPCR-PRV de salmones del Atlántico con HSMI del primer caso oficial.....	35
Tabla 1.8. Número de caso, fecha de recepción, especie, cantidad y lugar de obtención de las muestras de salmónidos de vida libre.....	37
Tabla 1.9. Número de caso, fecha de recepción, especie, cantidad y lugar de obtención de las muestras de salmónidos de vida libre.....	38
Tabla 1.10. Número de caso, fecha de recepción, especie, cantidad y lugar de obtención de las muestras de salmónidos de vida libre.....	39
Tabla 1.11. Resultado de la secuenciación de los productos de PCR-SAV obtenidos.....	40
Tabla 1.12. Prevalencia de ASCV según estadío de salmón del Atlántico en fase de agua dulce.....	43
Tabla 2a.1. Distribución de los centros con <i>Salmo salar</i> para la determinación de infección por PRV según región.....	48
Tabla 2a.2 Código de Centros y población de reproductores de <i>Salmo salar</i> temporada 2016 según Región.....	50
Tabla 2a.3. Muestras de reproductores de salmón del Atlántico para el diagnóstico de PRV.....	52
Tabla 2a.4. Valor de interpretación de las Odd Ratio del modelo.....	53
Tabla 2a.5. Caracterización del nivel de infección de los centros de agua dulce.....	55
Tabla 2a.6. Distribución geográfica de los centros muestreados y su condición de infección por PRV.....	56
Tabla 2a.7. Frecuencia de infección de PRV en salmón del Atlántico según tipo de flujo...	56
Tabla 2a.8. Frecuencia de infección de PRV según tipo de afluente de los centros de agua dulce de salmón del Atlántico.....	57
Tabla 2a.9. Frecuencias de variables independientes del modelo de GLIMMIX.....	57
Tabla 2a.10. Factores de riesgo y de protección del Modelo final de GLIMMIX.....	58
Tabla 2b.1. Resultados positivos de RT-qPCR Piscine Reovirus y Calicivirus.....	64
Tabla 2b.2. Resultados positivos de RT-qPCR Piscine Reovirus y Calicivirus del salmón del Atlántico para muestras de reproductores.....	65
Tabla 2b.3. Resultados de Co-infecciones descritas en Agua dulce y reproductores.....	66
Tabla 3.1. Resultado de inmunohistoquímica para Piscine orthoreovirus.....	76
Tabla 4.1. Datos generales de las cepas de <i>Renibacterium salmoninarum</i> .....	80
Tabla 4.2. Comparación de la sensibilidad de IFAT, nPCR y qPCR para la detección de <i>R salmoninarum</i> .....	90
Tabla 5.1. Número de reproductores analizados por región en screening realizado en el año 2016.....	92
Tabla 5.2. Prevalencia de BKD en reproductores según especies, año 2016.....	93
Tabla 5.3. Prevalencia de BKD en reproductores según sexo, año 2016.....	93
Tabla 5.4. Prevalencia de BKD en reproductores según región, año 2016.....	94
Tabla 5.5. Prevalencia de BKD en centros de s. Atlántico según etapa de producción.....	94

Tabla 5.6. Prevalencia de BKD en centros productores de salmón del Atlántico según región.....	95
Tabla 6.1. Resumen de las muestras enviadas.....	96
Tabla 6.2. Resumen de la química y plataforma utilizada por los laboratorios participantes.....	97
Tabla 6.3. Valores de Ct utilizando un valor de treshold de 0.1, calculados de cada Laboratorio.....	98
Tabla 6.4. Valores de Ct utilizando los valores de treshold propios.....	98
Tabla 6.5. Resultados positivos y negativos para calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica.....	99
Tabla 6.6. Valores del test de concordancia (Kappa).....	99
Tabla 6.7. Valores medios de Ct informados por cada Laboratorio usando sus propios valores de treshold.....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A. Organigrama de trabajo.....	9
Figura 1. Caso 575-15-E/ caso 577-15-E.....	33
Figura 2. Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ) con ascitis.....	35
Figura 2a.1. Población de <i>Salmo salar</i> y subpoblaciones según nivel de desarrollo en la población en estudio.....	48
Figura 2a.2. Distribución espacial de los centros del estudio y la detección de PRV en reproductores.....	54
Figura 2a.3. Porcentaje de infección de PRV en salmón del Atlántico de muestreo al azar por centro.....	55
Figura 2b.1. Resultados de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV según Región....	64
Figura 2b.2. Valores de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV en reproductores de salmón del Atlántico.....	65
Figura 2b.3 Valores de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV en salmones del Atlántico.....	67
Figura 2b.4: Gráficos bivariados de CT para los agentes virales: (A) PRV-ASCV. (B) PRV-IPNV.....	68
Figura 2b.5. Gráficos de correlación entre valores de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV.....	68
Figura 3.1. Corazón: Caso 575-15-E/ caso 577-15-E.....	72
Figura 3.2. Músculo esquelético rojo: Caso 575-15-E/ caso 577-15-E.....	72
Figura 3.3. Riñón: Tinción positiva a IHQ para Piscine orthoreovirus.....	74
Figura 3.4. Corazón: Tinción positiva a IHQ para Piscine orthoreovirus, color café rojizo...	75
Figura 4.1. Análisis filogenético <i>R. Salmoninarum</i> .....	87
Figura 4.2. Microfotografía de frotis renal sin dilución de <i>R salmoninarum</i> .....	88
Figura 6.1. Variabilidad de los valores de Ct por muestra interlaboratorios usando un valor de treshold de 0,1.....	101
Figura 6.2. Variabilidad de los valores de Ct informados por los Laboratorios participantes del Ring Test-BKD según lamuestra analizada.....	101

## Personal participante

La tabla 1.1 indica el personal participante del proyecto asociado a los objetivos específicos y a las actividades realizadas, y el organigrama en la figura A señala la organización del equipo de trabajo.

**Tabla 1.1. Personal participante**

Nombre	Cargo en el proyecto	Actividades	Objetivo asociado	N° HH / Mes	Meses
Ricardo Enríquez	Director	Dirección estratégica, investigación, informes publicaciones. Gestión administrativa	1, 2, 4, 5, 6	30	21
Alex Romero	Director alterno	Área técnicas moleculares, informes, publicaciones	1, 4, 5, 6	25	21
María José Navarrete	Investigador	Área patología e histología, publicaciones	1, 2, 3	25	8
Carla Rosenfeld	Investigador	Área epidemiología, informes, publicaciones	1, 2, 5, 6	25	8
Mónica Monrás	Investigador	Área diagnóstico virología	1, 4, 6	25	7
Vania Quinteros	Investigador	Área diagnóstico bacteriología. Med. vet a cargo de toma de muestras, procesamiento, registros	1, 2, 4, 5	25	7
Jorge Vásquez	Investigador	Área biología molecular	1, 2, 4, 5, 6	25	6
Augusto Vargas				reemplazo	7
Isabel Aguirre	Investigador	Área biología molecular	4, 6	25	5
Esteban Henríquez	Asistente	Preparación de materiales, Eliminación de muestras, estafeta		10	8
Patricio Peña	Estudiante Dr	Co-infección PRV/Calicivirus	2	20	10
Joaquín Bidart	Estudiante Mg	Epidemiología PRV	2	20	6

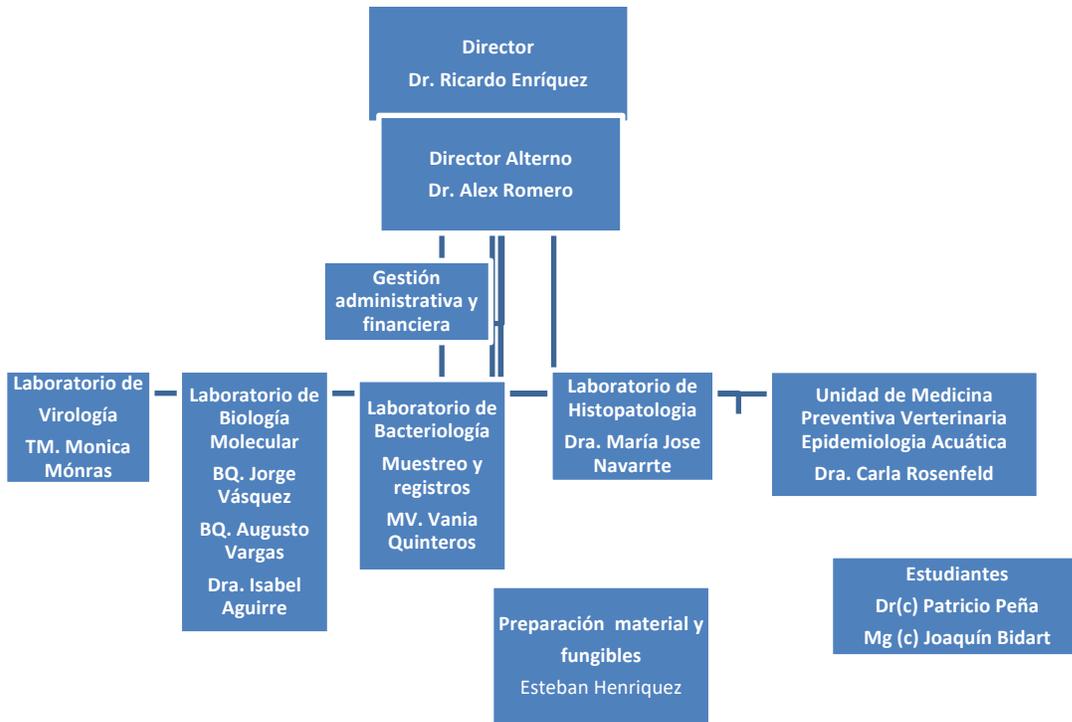


Figura A. Organigrama de trabajo

## Resumen ejecutivo

Durante el desarrollo del proyecto se realizó una reunión de coordinación en el inicio y reuniones de avance con el Comité del Proyecto, donde se decidieron ajustes en su ejecución, a destacar, la incorporación de estudiar la prevalencia de ASCV (Atlantic Salmon Calicivirus) en fase de agua dulce, su relación con PRV (Piscine Orthoreovirus) y con IPNV (Virus de la necrosis Pancreática Infecciosa) en el objetivo 2, en compensación a la actividad de implementar hibridación *in situ* de PRV.

En personal del proyecto, se incorporó partir de marzo 2016 el Sr. Augusto Vargas González, bioquímico, en reemplazo del Sr. Jorge Vásquez Torres, bioquímico. Adicionalmente, desde marzo 2017, la Dra. Isabel Aguirre Gil, encargada de la organización y desarrollo del Ring Test-BKD, comunicado en la última reunión del Comité realizada (24.04.17) en oficinas de SUBPESCA, Valparaíso. También se ha incorporado al Sr. Joaquín Bidart Pugliesi, alumno del Programa de Magister en Medicina Preventiva Veterinaria, patrocinado por la Dra. Carla Rosenfeld, para que analice los resultados y los datos del estudio de prevalencia de PRV en salmón del Atlántico en fase de agua dulce. Así mismo, el Sr. Patricio Peña Rehbein Dr(c) del Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, con el objetivo de determinar la prevalencia de ASCV en alevines, presmolt y smolt de salmones del Atlántico de cultivo en fase de agua dulce, mediante muestreo al azar e individual, y el estudio de la coinfección PRV - ASCV - IPN como tema de tesis doctoral patrocinada por Dr. Ricardo Enriquez.

Las principales actividades del Proyecto se ordenan según los objetivos específicos y se indican los resultados relevantes.

Respecto del objetivo específico 1: Realizar investigación de casos de enfermedades de etiología desconocida o emergente en especies de cultivo y ornamentales, a solicitud de la Autoridad sectorial, se realizaron en total 15 investigaciones de casos solicitados por SERNAPESCA. Lo relevante es que realizó una investigación de caso de alza de mortalidad, con sospecha de enfermedad emergente en salmones del Atlántico inicio de fase marina (Caso 25.015), que tiene la importancia de constituirse en el primer caso oficial confirmado de HSMI en el país, con signos clínicos en los peces afectados, mortalidad asociada y acumulada en rango de 3,16 – 42,65 % según jaula, en el periodo abril – septiembre 2015. La confirmación fue realizada por RT PCR-PRV y examen histológico. Fue propuesta la definición de caso de HSMI: PRV positivo con un diagnóstico de PCR (+) (reporta el laboratorio de diagnóstico) y HSMI, corresponde a PCR (+), con histología de HSMI, signos clínicos, si/no mortalidad asociada (reporta el centro de cultivo). La Autoridad sectorial,

SERNAPESCA, en base a estos antecedentes incorpora PRV/HSMI como enfermedad de Lista 3. Se realizó un seguimiento del primer caso oficial confirmado de HSMI en el país, en el mes de enero 2016 por RT PCR-PRV y examen histológico (Caso 02/16). Se detectó un aumento en el rango de CT y en el promedio de CT, lo que indicaría una disminución del RNA genómico de PRV en estos peces, y el examen histológico indica cronicidad, además se detectó positividad en 2/9 peces a ASCV (Calicivirus de salmón del Atlántico).

Adicionalmente, de muestras recibidas del IFOP de peces silvestres, salmones del Atlántico, trucha arcoíris y salmón coho, podemos indicar que se detecta PRV mediante RT PCR-PRV en estos peces, con valores de CT que indican la presencia del virus. Estos resultados demuestran la alta prevalencia del virus en el país, tanto en peces salmónidos silvestres como de cultivo, situación que ocurre en Noruega y Canadá. Importante es la primera detección de PRV en salmón coho que estimamos será publicado por el IFOP.

Respecto de otros casos, se realizaron análisis histológicos de muestras de trucha arco iris de fase marina indicadas como Casos 33.15 y 34.15, y del caso 35.15 análisis para enfermedades exóticas y PRV, resultando negativas para HSMI (Enfermedad de la Inflamación del músculo cardiaco y esquelético), VHSV (Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral) e IHNV (Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa). Y en el caso 34.15 se sospecha de SIT (Síndrome Idiopático de la Trucha) histológicamente por el edema en los órganos, sin embargo, no fue posible realizar inoculación experimental en truchas sanas porque los órganos se recibieron autorizados, y los peces afectados tuvieron brote de SRS, lo que invalidó el ensayo planificado.

Relevante también es el seguimiento realizado a casos sospechosos de SAV (Alfavirus de salmónidos) en truchas, que resultaron en detección de Ct para SAV, se confirmó en todos la ausencia de SAV (PD/SD, enfermedad del páncreas, alfavirus de salmónidos) en trucha arco iris en la piscicultura de origen y todos los contactos, mediante RT PCR-SAV, examen histológico y examen virológico. Interesante es que en la secuenciación realizada de las detecciones sospechosas de SAV por PCR, se identificaron secuencias relacionadas a genes de hemoglobina de las truchas.

Finalmente, durante junio 2017 se realizó seguimiento a lotes de truchas afectadas por una nueva condición, que corresponde a amebas de agua dulce asociadas a Enfermedad Nodular Branquial (NGD), diagnosticada por un Lab de la Red de SERNAPESCA, mediante examen histológico y se está

implementando PCR. Estas truchas están en pisciculturas relacionadas a la hoya hidrográfica del río Allipen.

No se recibieron muestras de peces ornamentales durante el desarrollo del proyecto a solicitud de la Autoridad.

Del objetivo específico 2: Estudio epidemiológico de PRV (HSMI) en el territorio nacional, hemos determinado la prevalencia en presmolt – smolt de salmones del Atlántico de cultivo en agua dulce mediante muestreo al azar e individual resultando un 47,3% de prevalencia en peces sanos. No hay diferencias mayores en la positividad de peces en condiciones de cultivo en flujo abierto o cerrado (recirculación). Además, del estudio epidemiológico de PRV (HSMI) y su asociación con ASCV en el territorio nacional, hemos determinado la prevalencia de Calicivirus en alevines, presmolt y smolt de salmones del Atlántico de cultivo en fase de agua dulce, resultando prevalencias de 4,8%, 17,5% y 50% mediante muestreo al azar e individual, respectivamente.

Como fue definido en la reunión de coordinación efectuada el 09.06.2015 en FIP Valparaíso, se implementó la técnica de PCR para la detección de ASCV, y estudiar la coinfección con PRV, condición que se ha comunicado en Noruega. La primera detección de ASCV (Atlantic Salmon Calicivirus) fue realizada por el Lab ADL desde salmones del Atlántico con un síndrome hemolítico-ictérico en fase marina de cultivo y se incorporó al proyecto, para dilucidar su prevalencia. Se estandarizó la técnica en base a un ultrámero (cDNA) de ambos genotipos del virus, para realizar su detección en estas muestras. Al respecto se seleccionó un estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias de la UACH (Sr. Patricio Peña) para realizar esta investigación de la coinfección PRV - ASCV como tema de tesis doctoral.

En el estudio de prevalencia de PRV en reproductores de salmón del Atlántico, que se realizó basado en las contra muestras oficiales (SERNAPESCA) del Programa Sanitario General de Reproductores (PSGR), los resultados indican una prevalencia promedio de 40,95% en reproductores de salmón del Atlántico para la temporada 2015. Interesante resultado que podría explicar la prevalencia observada en la fase de cultivo en agua dulce.

Se recibieron muestras de peces silvestres (salmónidos de vida libre) enviadas para confirmación de PRV/HSMI por el IFOP. Se confirmó PRV en salmón del Atlántico, trucha arco iris y salmón coho, e histológicamente se detectó HSMI en salmón coho, resultado de interés, ya que recientemente se publicó caso de HSMI en esta especie en cultivo, asociado a mortalidad.

De acuerdo al objetivo 3: Implementar y validar IHQ-PRV (HSMI), la implementación de la técnica de inmunohistoquímica para HSMI, se atrasó inicialmente. Esta técnica fue aplicada para el diagnóstico directo de PRV en las lesiones observadas en los tejidos diagnosticados previamente a través de histopatología. Se utilizó el método de detección con fosfatasa alcalina (Vectastain ABC-AP kit. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), utilizando el anticuerpo Anti- $\sigma 1$ , obtenido a través de la cooperación con el Instituto de Veterinaria Noruego (Dra. Torunn Taksdal, NVI, Oslo, Noruega). La aplicación de los anticuerpos y su dilución específica se determinaron en base a ensayos concentración dependiente. Las recuperaciones antigénicas también se realizaron en base a las recomendaciones para ese anticuerpo. Los resultados obtenidos fueron subóptimos en las muestras controles facilitadas también por el NVI (Oslo, Noruega). Para mejorar este resultado y en cooperación con el Lab PATHOVET, utilizando un anticuerpo desarrollado por este Lab, se logró los resultados esperados. Sin embargo, los resultados indican que esta técnica es de utilidad para investigación de HSMI, pero no se recomienda su uso en el diagnóstico de rutina, por los resultados obtenidos de su sensibilidad, al respecto, es positivo solo si los valores de Ct de PRV en las muestras de órganos (corazón y músculo esquelético) son menores a 25,7.

Del objetivo 4: Estandarización y validación de diagnóstico de *Renibacterium salmoninarum*, se implementó un PCR anidado, consistente en dos rondas de amplificación consecutivas, usando como templado en la segunda ronda el producto de PCR obtenido en la primera ronda de amplificación. Se utilizó como templado DNA genómico de *R. salmoninarum*, y también se implementó un PCR en tiempo real. Este ensayo es una variación publicada por Chase y col (2006), correspondiente a un qPCR con sonda. Nosotros realizamos un qPCR usando el mismo set de partidores sin la sonda donde se espera obtener amplicón de 69 pb, según alineamiento mediante BLAST usando el gen *msa1* codificante para P57 como referencia (GeneBank: AF458101.1), estandarizado con muestras de campo.

Adicionalmente, se implementó una encuesta muy simple de las técnicas en uso para el diagnóstico de BKD, que fue enviada oficialmente por SERNAPESCA a los Labs de la Red. Esta encuesta reveló que las técnicas moleculares (PCR) son las más usadas por los Labs., razón por la cual, en el Ring Test de detección de *R. salmoninarum* se decidió en evaluar la técnica de diagnóstico por PCR.

Ya se comunicaron en la reunión de coordinación sostenida, el 13.01.2016 en FIPA Valparaíso, las dificultades con el antisuero antiP57 que se utiliza para inmunofluorescencia (IFAT). Realizamos una exhaustiva búsqueda de posibles proveedores, lográndose encontrar al menos dos, sin embargo,

solo es posible obtener actualmente en el país el reactivo de un solo proveedor. Con este anticuerpo se realizó la evaluación de la técnica IFAT, resultando con sensibilidad limitada respecto de las técnicas de PCR.

Respecto del objetivo 5: Estudio epidemiológico de BKD, hemos rescatado algunos aislados de nuestro cepario, para los estudios de secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenéticos que se presentan en resultados. El estudio epidemiológico de BKD en reproductores, se realizó analizando los datos del Programa Sanitario de Reproductores (PSGR) de la temporada 2016, de los centros de reproductores activos considerando salmón coho, salmón del Atlántico y trucha arcoiris.

La prevalencia de BKD en reproductores de un 1,41% se considera baja, con una distribución desde la Araucanía hasta Magallanes. La prevalencia fue más alta en reproductores de la especie salmón coho (2,63%), seguido de salmón Atlántico (1,0%) y la trucha arco iris, afecta por igual a machos y hembras. La prevalencia a nivel de centros de agua dulce fue de 10%, siendo detectada en centros de las regiones del Bío-Bío, La Araucanía y los Lagos. Sin embargo, es referencial por la influencia del porcentaje de prevalencia de la región Bío-Bío. Se determinó que la prevalencia se incrementa durante la fase de agua dulce en alevines de 5,3% y en smolts 12,9%, lo que indicaría una eficiente transmisión horizontal de *Renibacterium salmoninarum* en agua dulce.

El objetivo de la prueba inter-laboratorios (Ring Test-BKD) fue evaluar el rendimiento de los laboratorios para diagnosticar muestras de ADN bacteriano de *R salmoninarum* a través de sus propias técnicas de PCR en tiempo real. Resultando con una sensibilidad de 94%, que se define como la capacidad de detectar a los verdaderos infectados (positivos), y una especificidad del 100%, que es la capacidad de detectar a los verdaderos sanos o no infectados (negativos). Sin embargo, se detectó una gran variabilidad en los valores de Ct del test. Esta alta variabilidad puede deberse a múltiples factores, entre los que se encuentran los diferentes equipos utilizados, la diferente química utilizada, los diferentes volúmenes de templado y de reacción utilizado, al segmento genético evaluado por cada laboratorio, entre otros. No obstante la gran variabilidad detectada, la totalidad de los laboratorios informaron valores de Ct para las muestras positivas y ausencia de señal para la muestra negativa.

El curso de actualización anual en salud y patología animal para funcionarios de SUBPESCA y SERNAPESCA, fue realizado en dos oportunidades, en “Enfermedades exóticas y emergentes de

salmonídeos” y “Enfermedades exóticas, emergentes y sindrómicas de importancia en acuicultura con 8 horas lectivas y evaluación final.

El taller de difusión y presentación de resultados se realizó el día 20 de julio en el hotel Solace de Puerto Varas, asistiendo 45 profesionales de los Labs de la Red de Sernapesca, funcionarios de Sernapesca, del IFOP, de las empresas productoras de salmón, Intesal, academia, y de servicios a la salmonicultura. Se recibieron dos comentarios de los resultados entregados, que dicen relación a la prevalencia de BKD en la región del Bío-Bío que pueden influenciar los resultados dado que se analizaron solo 2 pisciculturas, resultando un 50% de prevalencia de BKD a nivel de centros, y para el cálculo de la variación de los resultados de Ct del Ring Test-BKD, que no es conveniente usar el valor de treshold fijo 0,1 porque depende de cada equipo y es necesario normalizar con reactivo de ROX, que no todos los Labs lo utilizan, de esta forma no se puede normalizar para todos los Labs.

## **Abstract**

The main activities of the Project are organized according to the specific objectives and the relevant results are indicated. Regarding the specific objective 1: Carry out investigations of cases of unknown or emerging aetiology diseases in crop and ornamental species, at the request of the sectoral Authority, a total of 15 investigations of cases requested by SERNAPESCA were carried out. The relevant case is one of rising mortality, with suspected emergent disease in Atlantic salmon in the beginning of the marine phase (Case 25.015), which has the importance of being the first confirmed official case of HSMI in the country, with clinical signs in the affected fish, with associated and accumulated mortality, in the period April – September 2015, showing a range of 3.16 - 42.65% according to the cage. RT PCR-PRV and histological examination were performed for confirmation. The definition of HSMI case was proposed for the following reasons: positive PRV with a PCR (+) diagnosis (reported by the diagnostic laboratory) and HSMI, corresponds to PCR (+), with HSMI histology, clinical signs, yes/no associated mortality (reported by the fish farm). The Authority, SERNAPESCA, based on this background, incorporates PRV/HSMI as a List 3 disease. The first HSMI case, officially confirmed in the Chile was reported on January 2016 through PRV RT-PCR and histological examination (Case 02/16). An increase in the CT range and in the CT average was detected, indicating a decrease in PRV genomic RNA in these fish, and histological examination indicates chronicity, and positivity was detected in 2/9 fish to ASCV (Atlantic salmon Calicivirus).

Regarding other cases, histological analyses of marine phase rainbow trout samples indicated as Cases 33.15 and 34.15, and of case 35.15 analysis for exotic diseases and PRV, were found to be negative for HSMI (Heart and Skeletal Muscle Inflammation), VHSV (Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus) and IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus). And in case 34.15 SIT (Trout Idiopathic Syndrome) is detected histologically, however, it was not possible to carry out an experimental inoculation in healthy trout because the organs were received authorized and the affected fish had a SR outbreak, which invalidated the planned essay.

Also relevant is the monitoring of suspected SAV cases in trout, which resulted in detection of Ct for SAV and confirmed in all of them, the absence of SAV (PD / SD, pancreas disease, salmonid alphavirus) in rainbow trout from the fish farm of origin and all contacts, through RT PCR-SAV, histological examination and virological examination. Interesting is, that in the sequencing of the suspected SAV detections by PCR, sequences related to trout haemoglobin genes were identified.

Finally, during June 2017, a follow up of trout batches affected by a new condition was performed, corresponding to freshwater amoebas associated with Nodular Gill Disease (NGD), diagnosed by a Lab of the SERNAPESCA Network, by histological examination and currently PCR is being implemented. These trouts are in fish farms related to the hydrographic basin of the Allipen River.

No samples of ornamental fish were received during the development of the project at the Authority's request.

From the specific objective 2: Epidemiological study of PRV (HSMI) in the national territory, we have determined the prevalence in presmolt – smolt Atlantic salmon in freshwater by random and individual sampling resulting in a 47.3% prevalence in healthy fish. There are no major differences in fish positivity under open or closed flow (recirculation) farming conditions. In addition, of the samples received from the IFOP of wild fish, Atlantic salmon, rainbow trout and coho salmon, we can indicate that PRV was detected with RT PCR-PRV in these fish, with TC values indicating the presence of the virus. These results demonstrate the high prevalence of this virus in the country, both wild salmon and farmed fish, a situation that also occurs in Norway and Canada. It is Important to mention the first detection of PRV in coho salmon. We estimate it will be published by the IFOP. Furthermore, from the epidemiological study of PRV (HSMI) and its association with ASCV in the national territory, we have determined the prevalence of ASCV in juvenile freshwater salmon fish, presmolt and smolt, resulting in prevalence of 4.8 %, 17.5% and 50% by random and individual sampling, respectively.

The PCR technique was implemented for the detection of ASCV, and to study co-infection with PRV, a condition that has been reported in Norway. The first detection of ASCV (Atlantic Salmon Calicivirus) was performed by the ADL Lab from Atlantic salmon with a haemolytic-icteric syndrome in the marine phase of growing and was incorporated into the project to elucidate its prevalence. The technique was standardized based on an ultramer (cDNA) of both virus genotypes, to realize its detection in these samples. In this regard, a student of the PhD Program in Veterinary Sciences of the UACH (Mr. Patricio Peña) was selected to carry out this investigation of the PRV - ASCV coinfection as a doctoral thesis topic.

In the study of PRV prevalence in Atlantic salmon in their reproductive phase, which was based on official counter samples (SERNAPESCA) of the General Reproductive Health Program (PSGR), the results indicate an average prevalence of 40.95% in Atlantic salmon breeders for the 2015 season.

The above mentioned is an interesting result that could explain the prevalence observed in the freshwater farming stage.

Samples of wild fish (free living salmonids) sent by the IFOP were received for confirmation of PRV/HSMI. PRV was confirmed in Atlantic salmon, rainbow trout and coho salmon, and histologically HSMI was detected in coho salmon, a result of interest, as it was recently published a case of HSMI in farmed fish of this species, associated with mortality.

According to objective 3: Implement and validate IHQ-PRV (HSMI), the implementation of the immunohistochemistry technique for HSMI was initially delayed. This technique was applied for the direct diagnosis of PRV in wounds observed in tissues previously diagnosed through histopathology. The method of detection with alkaline phosphatase (Vectastain ABC-AP kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was performed, using Anti- $\sigma$ 1 antibody, obtained through cooperation with the Norwegian Veterinary Institute (Dr. Torunn Taksdal, NIV, Oslo, Norway). Application of the antibodies and their specific dilution were determined based on concentration-dependent assays. Antigen recoveries were also performed based on the recommendations for that antibody. The results obtained were suboptimal in the control samples also provided by the NVI (Oslo, Norway). To improve this result, and in cooperation with the PATHOVET Lab, using an antibody developed by this Lab, the expected results were achieved. However, the results indicate that this technique is useful for the investigation of HSMI, but its use in the routine diagnosis is not recommended, because the results obtained from its sensitivity, in this respect, is positive only if the values of Ct of PRV in organs samples (heart and skeletal muscle) are less than 25.7.

From objective 4: Standardization and diagnostic validation of *Renibacterium salmoninarum*, a nested PCR, consisting of two consecutive amplification rounds was implemented, using the PCR product obtained in the first round of amplification as the second round. Genomic DNA of *R. salmoninarum* was used as annealed, and real-time PCR was also implemented. This assay is a variation published by Chase et al (2006), corresponding to a qPCR with probe. We performed a qPCR using the same set of partitions without the probe where we expect to obtain a 69 bp amplicon, according to BLAST alignment using the msa1 gene coding for P57 as a reference (GeneBank: AF458101.1), standardized with field samples.

Additionally, a very simple survey of the techniques in use for the diagnosis of BKD was implemented, which was officially sent by SERNAPESCA to the Laboratories of the Network. This

research revealed that molecular techniques (PCR) are the most used by laboratories, reason why, in the Ring detection test of *R. salmoninarum* was decided to evaluate the diagnostic technique by PCR.

The difficulties with the anti-P57 antiserum used for immunofluorescence (IFAT) were already reported at the meeting of sustained coordination on 13.01.2016 at FIPA Valparaiso. We carried out an exhaustive search of possible suppliers, obtaining at least two, however, it is only possible to obtain the reagent from a single supplier in the country. With this antibody the evaluation of the IFAT technique was performed, resulting in a limited sensitivity with respect to PCR techniques.

Regarding objective 5: BKD epidemiological study, we have rescued some isolates from our strain, for the sequencing studies of PCR products and phylogenetic analyses that are presented in the results. The epidemiological study of BKD in breeders was carried out by analysing data from the Breeders Health Program (PSGR) for the 2016 season, from the active brood stock's centres for salmon coho, Atlantic salmon and rainbow trout. The prevalence of BKD in breeders of 1.41% is considered low, with a distribution from Araucanía to Magallanes. The prevalence was higher in coho salmon breeders (2.63%), followed by Atlantic salmon (1.0%) and rainbow trout, affects males and females alike. The prevalence of freshwater centres was 10%, being detected in the centres of the Bío-Bío, La Araucanía and Los Lagos regions. However, it is referential due to the influence of the prevalence percentage in the Bío-Bío region. It was determined that the prevalence increases during the freshwater phase in juveniles of 5.3% and in smolts 12.9%, indicating an efficient horizontal transmission of *Renibacterium salmoninarum* in fresh water.

The objective of the inter-laboratory test (Ring Test-BKD) was to evaluate the performance of laboratories to diagnose bacterial DNA samples of *R. salmoninarum* through their own real-time PCR techniques. Resulting in a sensitivity of 94%, which is defined as the ability to detect true infected (positive), and a specificity of 100%, which is the ability to detect the true healthy or uninfected (negative). However, a large variability was detected in the Ct values of the test. This high variability can be due to multiple factors, among which are the differences in equipment that are used, the different chemical procedures, the different tempering and reaction volumes, to the genetic segment evaluated by each laboratory, among others. Despite the great variability detected, all the laboratories reported values of Ct for the positive samples and absence of signal for the negative sample.

## Objetivo General

Realizar investigación en epidemiología y técnicas de diagnóstico en enfermedades emergentes o exóticas, con énfasis en PRV y BKD.

## Objetivos Específicos

1. Realizar investigación de casos de enfermedades de etiología desconocida o emergente en especies de cultivo y ornamentales, a solicitud de la Autoridad sectorial.
2. Efectuar un estudio epidemiológico que dé cuenta de la situación del patógeno Piscine Reovirus (HSMI), en el territorio nacional.
3. Implementar y validar el método de diagnóstico de inmunohistoquímica para el patógeno Piscine reovirus (HSMI).
4. Estandarización y validación del método de diagnóstico para el patógeno *Renibacterium salmoninarum*.
5. Realizar un estudio epidemiológico que dé cuenta de la situación actual de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (*Renibacterium salmoninarum*) en el territorio nacional.
6. Realizar un ensayo de Ring Test del método de diagnóstico para enfermedades y agentes patógenos emergentes y exóticos, considerando los utilizados por la red de laboratorios de diagnóstico del Servicio y por entidades de investigación en caso de ser requerido.

## Introducción

La industria acuícola nacional tiene una importancia fundamental para el desarrollo socioeconómico del país sobre todo en la zona sur austral. De acuerdo al DS (MINECON) N°319 de 2001, las enfermedades exóticas pueden tener alto impacto en el estado sanitario de las especies hidrobiológicas de cultivo, por cuanto pueden provocar importantes pérdidas de biomasa y por ende económicas, son listadas en la Lista 1 indicadas en la RES SSP N° 1741 (2013), y corresponden en su mayoría a enfermedades de notificación obligatoria a la OIE. En consideración a los compromisos internacionales del país, es necesario certificar su ausencia y de sus agentes causales, sin embargo, lo más importante es tener disponibles estrategias de diagnóstico eficiente y precoz, con el objetivo fundamental de impedir su diseminación en nuestro ecosistema. También es necesario incorporar las enfermedades emergentes o re-emergentes y sindrómicas, de las cuales la Autoridad sectorial es responsable de realizar la investigación correspondiente. SERNAPESCA realiza una vigilancia activa respecto de las enfermedades listadas en la Lista 1 de EAR y realiza vigilancia de EAR Lista 2, además de la investigación oficial de la mortalidad alta inexplicada y de enfermedades sindrómicas.

Mediante estudios realizados el año 2011-2012 y 2013-2014 por SERNAPESCA y SUBPESCA se evidenció la presencia de PRV (Piscine Reovirus) en fase de cultivo en agua marina y en agua dulce, respectivamente. La Inflamación del Músculo Cardíaco y Esquelético (HSMI) es una enfermedad de salmón del Atlántico en fase marina de cultivo y se ha identificado en Noruega y Chile, entre otros países. HSMI tiene una etiología viral producida por un Piscine Reovirus (PRV), que afecta principalmente el músculo cardíaco y esquelético. Por lo general es una enfermedad de mortalidad moderada (hasta 20 %) pero con una alta morbilidad (100 %), y se presenta en Noruega entre 5 a 9 meses después del traslado al mar. De dos estudios realizados en Chile en centros de mar, se determinó que PRV se encuentra presente en la especie *Salmo salar* en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Por otro lado, de los 28 centros seleccionados, 20 presentaron resultados positivos a RT-PCR para PRV, lo que corresponde al 72% de los centros muestreados. En los peces que se detectó PRV, no se logró determinar la presencia de lesiones ni mortalidad asociada a HSMI. En función de los antecedentes de los estudios anteriores, se evidencia la necesidad de ampliar el estudio a los centros en la fase de producción en agua dulce, para verificar o descartar la presencia de Piscine Reovirus (PRV) en esta etapa del ciclo de producción.

Es de interés realizar mayores estudios que permitan completar los estudios realizados para determinar sus características epidemiológicas en nuestro país y eventualmente establecer medidas de vigilancia y/o control. Adicionalmente, los informes sanitarios oficiales han mostrado un aumento en la detección de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD) en los chequeos sanitarios de reproductores y en el periodo de engorda del salmón coho y Atlántico, por lo que es necesario investigar eventuales variaciones en el agente causal y revisar y optimizar los métodos de diagnóstico actualmente en aplicación.

La Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD, por sus siglas en inglés), causada por *Renibacterium salmoninarum*, agente intracelular facultativo, causa la enfermedad en las tres especies en producción intensiva en el país, tanto en la fase de agua dulce como en agua de mar, y se transmite horizontal y verticalmente. Actualmente ocasiona el 3,5% de la mortalidad total, y tiene un efecto no evaluado en pérdida de calidad del filete y en el crecimiento de los peces. Con impacto creciente en la industria, su mayor incidencia es en la XII región.

*Renibacterium salmoninarum* es un patógeno intracelular facultativo de los salmónidos que produce la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD, por su sigla en inglés). El agente es una bacteria gram positiva de lento crecimiento que sobrevive al interior de macrófagos del tejido renal (Fryer and Sanders 1981, Grayson et al 2002, Wiens 2011). Genéticamente representa un grupo muy conservado de bacterias, con una muy baja diversidad genética intra-especie (Brynildsrud et al 2014, Grayson et al 2000, Grayson et al 1999). En la actualidad se describen dos grupos genéticos principales o linajes. El linaje 1 incluye una mezcla de aislados europeos y norteamericanos y el linaje 2 está restringido exclusivamente a aislados europeos (Brynildsrud et al 2014).

La Enfermedad bacteriana del riñón posee un curso crónico y en muchos de sus aspectos se asemeja a las infecciones producidas por mycobacterias, involucrando un balance entre los componentes de la respuesta inmune del hospedero que puede inclinarse hacia el mismo hospedero o hacia el patógeno. Esto, dependiendo de factores genéticos, pero también ambientales.

En los casos clínicos, la histopatología de BKD muestra una inflamación granulomatosa desarrollada por el hospedero con el fin de encapsular al agente. Los tejidos afectados presentan una intensa infiltración mononuclear, con gran activación y proliferación de macrófagos y probablemente también, depósito de complejos antígeno-anticuerpo asociándose este cuadro a una reacción de hipersensibilidad tipo III (Bruno 2013). Con respecto a este último punto, la producción de

anticuerpos específicos generados contra *R. salmoninarum* no sería protectora e incluso estaría contribuyendo a la progresión de la enfermedad y a la sobrevivencia de la bacteria en el hospedero afectado (Grayson et al 2002).

La información epidemiológica disponible en la literatura científica no hace mención acerca de lo que ocurre a nivel nacional con respecto a prevalencia de infección y de enfermedad, por lo que los resultados de este proyecto permiten aclarar el escenario actual de *R. salmoninarum* en nuestro país. Es de interés realizar mayores estudios que permitan completar los realizados para determinar las características epidemiológicas de la enfermedad en nuestro país y eventualmente establecer medidas de vigilancia y/o control, por lo que es necesario investigar eventuales variaciones en el agente causal y revisar y optimizar los métodos de diagnóstico actualmente en aplicación.

En este contexto, el análisis del gen ribosomal 16S (rRNA) permite la determinación de relaciones filogenéticas entre aislados de *Renibacterium salmoninarum*. EL gen 16S rRNA se encuentra en todas las Eubacterias y por ende, la comparación de las secuencias de DNA de este gen nos permite inferir relaciones filogenéticas entre bacterias. El gen 16S rRNA es generalmente aceptado como el cronómetro molecular, debido a que es funcionalmente constante y además muestra una estructura en mosaico de regiones variables y otras más conservadas. La comparación de secuencias de genes 16S rRNA es una herramienta importante para diferenciar bacterias a nivel de género y clasificar además cepas de una misma especie en subespecies. De hecho, diferencias de secuencias de DNA pueden ocurrir en genes homólogos de diferentes cepas de una misma especie bacteriana y todas estas sustituciones de nucleótidos son llamadas colectivamente, variaciones intraespecíficas (Hansson et al 2008). Esta característica también es encontrada en el gen 16S rRNA, donde se ha detectado una considerable variación intraespecífica para este tipo de genes del operón ribosomal (Clayton et al 1995). Basados en estos antecedentes, se procedió a determinar las diferencias filogenéticas entre aislados y cepas de *R. salmoninarum* en base a la amplificación y secuenciación de gen rRNA de esta bacteria.

El Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática del Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile, fue designado como Laboratorio Nacional de Referencia de enfermedades exóticas y emergentes de especies hidrobiológicas de conformidad con el art. 68 del DS 319 del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo según resolución exenta N° 1448 de 2011 de SERNAPESCA. En esta Resolución Exenta se señalan actividades y exigencias del Lab de Referencia respecto de las enfermedades exóticas acordes a los objetivos de este proyecto.

## Referencias

Bruno, D.W., Noguera, P.A., Poppe, T.T. 2013. Bacterial Diseases, In: *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. Springer, 87-89.

Brynildsrud, O., Feil, E.J., Bohlin, J., Castillo-Ramirez, S., Colquhoun, D., McCarthy, U., Matejusova, I.M., Rhodes, L.D., Wiens, G.D., Verner-Jeffreys, D.W. 2014. Microevolution of *Renibacterium salmoninarum*: evidence for intercontinental dissemination associated with fish movements. *ISME J* 8, 746-756.

Fryer, J.L., Sanders, J.E. 1981. Bacterial kidney disease of salmonid fish. *Ann Rev Microbiol* 35, 273-298.

Grayson, T.H., Atienzar, F.A., Alexander, S.M., Cooper, L.F., Gilpin, M.L. 2000. Molecular diversity of *Renibacterium salmoninarum* isolates determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 66, 435-438.

Grayson, T.H., Cooper, L.F., Atienzar, F.A., Knowles, M.R., Gilpin, M.L., 1999. Molecular differentiation of *Renibacterium salmoninarum* isolates from worldwide locations. *Appl Environ Microbiol* 65, 961-968.

Grayson, T.H., Cooper, L.F., Wrathmell, A.B., Roper, J., Evenden, A.J., Gilpin, M.L. 2002. Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. *Immunology* 106, 273-283.

Wiens, G.D. 2011. Bacterial Kidney Disease (*Renibacterium salmoninarum*), In: Woo P.T.K., B., D.W. (Ed.) *Fish Diseases and Disorders: Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International, Preston, UK, 338-374.

## **Metodología de trabajo**

La descripción de la metodología que se utilizará para cumplir el objetivo general, se detallan por actividades que se desarrollan para completar los objetivos específicos enunciados, y se indican en los resultados por objetivos. En general consideran test moleculares, de aislamiento, examen clínico e histológico y estudios epidemiológicos. Las especies de peces objeto del proyecto son los salmónidos, específicamente salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arco iris (*O. mykiss*), y otros que la Autoridad sectorial indique como especie objetivo de estudio. Las sospechas de enfermedades exóticas en peces de cultivo, se trataron como casos sospechosos y en consecuencia se desarrollaron e implementaron técnicas de diagnóstico molecular e histológico en su oportunidad y en contacto con Laboratorios de Referencia OIE, para los casos sospechosos de VHS, IHN, SAV.

### **Actividad: Estudio oficial de diagnóstico, investigación de casos de enfermedades de etiología desconocida o emergente en especies de cultivo, ornamentales y silvestres.**

Durante el proyecto se ejecutaron 15 investigaciones de diagnóstico oficial o análisis y/o confirmación diagnóstica a solicitud por la Autoridad sectorial, ante caso de mortalidad no explicada, o en casos de sospecha de enfermedades de etiología exótica, de enfermedades sindrómicas en especies de cultivo, para lo cual el jefe del proyecto realizó visita con funcionarios de SERNAPESCA al sitio de producción o lugar de ocurrencia del caso, con la debida organización para la toma de muestras y su transporte al laboratorio, con el objetivo de confirmar o descartar la ocurrencia de la enfermedad. Así mismo, se recopiló la información epidemiológica necesaria para su estudio posterior, con el fin de realizar las recomendaciones a la Autoridad sectorial para el análisis y la evaluación del riesgo y proponer las actividades de un plan de emergencia específico. Adicionalmente, se recibieron muestras tomadas de salmónidos silvestres enviadas por el IFOP, para la confirmación de PRV/HSMI, estos resultados se incluyen en el Objetivo específico 2.

### **Actividad: Toma de muestras para PCR-PRV e histología**

Para los análisis de laboratorio una vez colectados los peces en terreno (transversal a todas las actividades), se procede a realizar la necropsia y toma de muestras para laboratorio. Una vez expuestos los órganos por remoción de la pared lateral o corte de línea media ventral se proceden a la extracción de muestras de los órganos blanco: corazón (incluyendo aurícula) y riñón anterior.

La detección del virus PRV se realizó en forma individual en muestreos al azar, y en pools de 3 ejemplares en muestreo dirigido. Para PCR-PRV se procede a extraer un trozo de corazón (incluyendo aurícula) y riñón anterior depositados en tubo Ependorf con preservante RNA later® y posterior a su extracción mantener a 4°C o con gelpack hasta su traslado al lab. La tabla 1.2 describe las muestras obtenidas de salmones del Atlántico en fase de agua dulce para la determinación de la prevalencia de PRV/HSMI.

**Tabla 1.2. Estadío de salmones del Atlántico (*Salmo salar*) en fase de agua dulce, indicando la región de la piscicultura, el código SERNAPESCA de la muestra y el número de caso del Laboratorio.**

MUESTREO AGUA DULCE S. ATLÁNTICO PROYECTO FIP 2014-61			
REGIÓN	CÓDIGO MUESTRA	Nº CASO	Estadío
LOS RÍOS	141010543	020/14	Smolt
REGIÓN DEL MAULE	7102-0021	010/14	Pre Smolt
REGIÓN DEL BIO-BÍO	8110-0107	034/14	Pre Smolt
NOVENA REGIÓN	9101-0109	017/14	Smolt
	9101-0098	023/14	Pre Smolt
	9101-0085	026/14	Pre Smolt
	9101-0121	027/14	Pre Smolt
	9101-0118	031/14	Pre Smolt
	9101-0128	032/14	Pre Smolt
	9101-0142	036/14	Pre Smolt
	9101-0147	037/14	Smolt
	9101-0091	045/14	Smolt
	9101-0134	055/14	Smolt
DÉCIMA REGIÓN (Puerto Montt)	9101-0096	056/14	Smolt
	1010113868	013/14	Smolt
	101014204	014/14	Smolt
	101014051	015/14	Smolt
	101010330	029/14	Pre Smolt
	101014142	030/14	Smolt
	101014055	042/14	Pre Smolt
	101011937	048/14	Pre Smolt
	101010147	051/14	Pre Smolt
101014078	053/14	Pre Smolt	
DÉCIMA REGIÓN (Castro)	101013957	057/14	Smolt
	101012744	043/14	Pre Smolt
	101010675	041/14	Pre Smolt
	101010594	046/14	Pre Smolt

REGIÓN DE AYSÉN	11201-0869-1 al 14	033/14	Smolt
-----------------	--------------------	--------	-------

Para examen histológico se tomaron trozos de corazón (incluyendo aurícula), ciegos pilóricos (páncreas), músculo (bajo la aleta dorsal y sobre la línea media) y riñón medio, que se depositaron en frascos con formalina bufferizada al 10%. En la tabla 1.3 se señalan los N° de caso y códigos de las muestras analizadas para el estudio de prevalencia de PRV/HSMI.

**Tabla 1.3 Identificación de las muestras analizadas mediante examen histopatológico indicando número de caso, región y código de muestreo.**

N° Caso Patología Animal	N° Caso Ictiopatología	N° Muestra	Rótulo tubo	REGIÓN	Código muestras
					SERNAPESCA
484-14-E	Caso 10/14	2	C2	Region del Maule	7102-0021
485-14-E	Caso 10/14	7	D2		
486-14-E	Caso 14/14	1	1	Décima región (Pto Montt)	101014204
487-14-E	Caso 14/14	10	10		
488-14-E	Caso 15/14	2	2	Décima región (Pto Montt)	101014051
490-14-E	Caso 20/14	2	30F	Los Ríos	141010543
491-14-E	Caso 23/14	3	c	Novena Región	9101-0098
492-14-E	Caso 23/14	7	g		
493-14-E	Caso 23/14	8	h		
494-14-E	Caso 26/14	12	L	Novena Región	9101-0085
495-14-E	Caso 32/14	2	b	Novena Región	9101-0128
496-14-E	Caso 36/14	11	k	Novena Región	9101-0142
498-14-E	Caso 41/14	12	12	Décima Región (Castro)	101010675
499-14-E	Caso 42/14	2	2	Décima región (Pto Montt)	101014055
504-14-E	Caso 55/14	1	a	Novena Región	9101-0134
505-14-E	Caso 55/14	10	j		

Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática y al Laboratorio de Anatomía Patológica de la Universidad Austral de Chile, respectivamente.

**Actividad: Análisis de Laboratorio**

De las muestras obtenidas de los peces de cada centro de cultivo para detectar el virus PRV y eventualmente HSMI con examen histológico de muestras de peces con resultado de Ct < a 35, según se describe.

**Actividad: Homogenización de tejidos de peces para extracción de ácidos nucleicos (I-MOL-01)**

Metodología para realizar la homogenización de las muestras de tejido de peces para obtener células en suspensión con el objetivo de utilizarlas para extracción de ácidos nucleicos (I-MOL-03, I-MOL-04 ó I-MOL-05 según corresponda).

**Actividad: Extracción de ARN total (RNA Total Kit EZNA) (I-MOL-02)**

Metodología para realizar la extracción de ARN total a partir de las muestras homogenizadas en I-MOL-01 para utilizarlas como templado para la síntesis de cDNA o en RT-PCR en tiempo real en un paso.

**Actividad: Amplificación por RT-PCR en tiempo real para reovirus (HSMI) (I-MOL-23)**

Metodología para amplificar específicamente el segmento L1 del genoma del Reovirus que provoca la Inflamación de músculo esquelético y cardiaco (HSMI) por RT-PCR en tiempo real en un paso utilizando los partidores y la sonda TaqMan descritos por Palacios et al (2010), utilizando como templado el RNA total obtenido en I-MOL-02.

PARTIDORES Y SONDA

L1F 5- TGC TAA CAC TCC AGG AGT CAT TG - 3

L1R 5 -TGA ATC CGC TGC AGA TGA GTA - 3

L1P5 -FAM – CGC CGG TAG CTC T – MGBNFQ – 3

**Actividad: Amplificación por RT-PCR tiempo real factor de elongación 1 $\alpha$  (I-MOL-10)**

Metodología para amplificar por PCR en tiempo real específicamente un gen de expresión constitutiva del pez, que permite controlar la calidad de la muestra y el proceso de extracción. Deberá ser incorporado en cantidad equivalente al menos al 30% del batch de muestras a analizar. Utilizaremos los partidores y la sonda TaqMan descritos por Snow (2006), utilizando como templado el RNA total obtenido en I-MOL-02.

PARTIDORES Y SONDA

Elf 1 $\alpha$  F 5'-CCC CTC CAG GAC GTT TAC AAA - 3'

Elf 1 $\alpha$  R 5'-CAC ACG GCC CAC AGG TAC A - 3'

Elf 1 $\alpha$  Sonda FAM 5'-ATC GGT GGT ATT GGA AC - 3'

Actividades del proceso idénticas a las descritas para el RT-PCR en tiempo real para reovirus (HSMI).

**Actividad: Ligación y clonamiento de productos de PCR para secuenciación**

Se enviarán a secuenciar los productos de PCR para confirmar diagnóstico molecular en caso de sospecha de enfermedades exóticas, o para confirmar un diagnóstico. Se secuenciaron productos de PCR-SAV.

**Actividad: Definición de caso para HSMI**

De los resultados obtenidos se ha propuesto una definición de caso para HSMI.

**Actividad: Implementación de RT PCR para ASCV**

Las metodologías de la implementación de PCR para la detección de Calicivirus de salmón del Atlántico se describen en los resultados del objetivo.

**Actividad: Implementación de PCR para *Renibacterium salmoninarum***

Las metodologías de la implementación de PCR para la detección de BKD se describen en los resultados del objetivo.

**Actividad: Estudio epidemiológico de PRV/HSMI**

El diseño del estudio epidemiológico de PRV/HSMI en agua dulce se detalla en los resultados, para facilitar su comprensión, y se define como un estudio para determinar la prevalencia de PRV/HSMI en salmón del Atlántico presmolt-smolt y reproductores (ver Obj. Específico 2a).

**Actividad: Toma de muestras para PCR-ASCV e histología**

Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática y al Laboratorio de Anatomía Patológica de la Universidad Austral de Chile, respectivamente.

**- Actividad: Estimación de la prevalencia de Calicivirus en salmón del Atlántico (*Salmo salar*)**

Las muestras analizadas corresponden a muestras de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) provenientes de distintas pisciculturas de agua dulce a nivel nacional (Tabla 1.4). El muestreo estadístico se realizó de forma aleatoria y estratificado. En el diagnóstico de Calicivirus se utilizaron

los partidores de Mikalsen *et al* 2014 (doi: 10.1371/ journal.pone. 0107132), mediante la técnica de PCR tiempo real.

La prevalencia de Calicivirus se calculó como:

**Tabla 1.4. Número de casos según estadios de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), positivos y negativos mediante RT qPCR a Calicivirus (ASCV)**

N° Caso	PCR Calicivirus		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Alevin</b>	6	120	126
12/14		14	14
16/14		14	14
18/14		14	14
19/14		14	14
21/14		14	14
25/14		14	14
47/14		14	14
49/14	6	8	14
59/14		14	14
<b>Pre Smolt</b>	22	104	126
26/14	10	4	14
32/14		14	14
34/14	1	13	14
36/14		14	14
41/14		14	14
46/14		14	14
48/14		14	14
51/14	11	3	14
53/14		14	14
<b>Smolt</b>	42	42	84
13/14		14	14
15/14	14		14
17/14		14	14
20/14		14	14
33/14	14		14
56/14	14		14
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>266</b>	<b>336</b>

**- Actividad: Determinación del tamaño de la muestra de reproductores de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) para la determinación de PRV**

De los datos enviados por SERNAPESCA, que resume los centros activos con reproductores de *Salmo salar* para la temporada 2016, se determinó una población en estudio de 179.119 reproductores. Los centros pertenecientes a 14 pisciculturas, distribuidos en 3 regiones, se detallan en el Obj. Específico 2.

## **Resultados Objetivo 1**

Los resultados se presentan según el objetivo específico e incorporan la metodología utilizada de forma resumida, antecedentes específicos, resultados y discusión, y la bibliografía cuando corresponde.

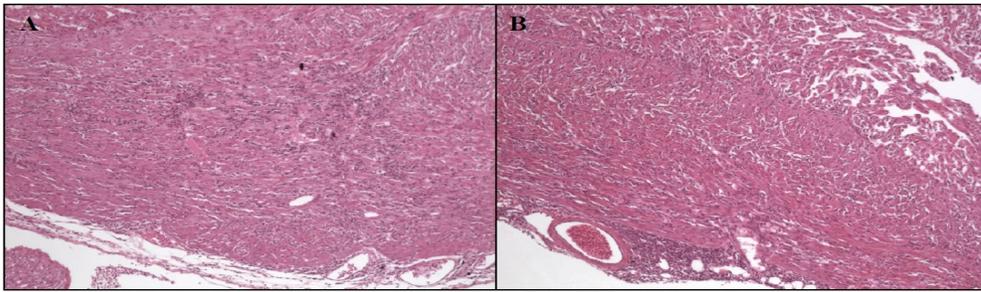
### **Objetivo específico 1: Realizar investigación de casos de enfermedades de etiología desconocida o emergente en especies de cultivo y ornamentales, a solicitud de la Autoridad sectorial.**

#### **1.1 Resultados de caso de alza de mortalidad en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de cultivo, investigación oficial.**

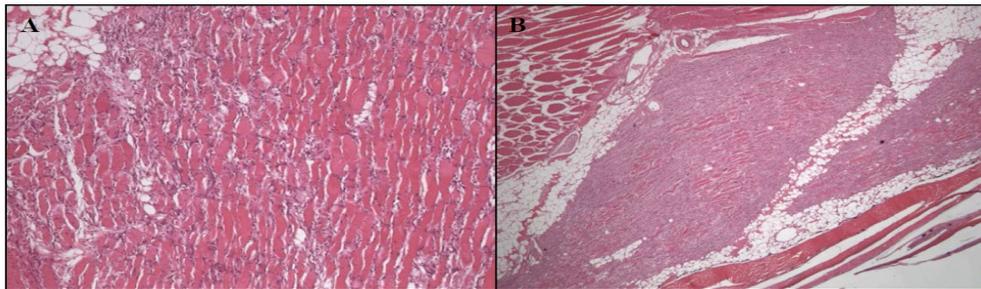
Se realizaron 15 investigaciones de casos a petición de la Autoridad sectorial y 13 casos para la confirmación de PRV/HSMI en salmónidos silvestres. En los resultados se incluyen los más relevantes y se presentan como informes de caso.

El Caso N° 025.15 que incluye resultados de RT PCR-PRV, histología, cultivos celulares, parámetros sanguíneos, de una muestra de 15 salmónes del Atlántico, y se incluyeron aparentemente sanos obtenidos al azar. Todos resultaron positivos a PRV mediante RT PCR-PRV con un rango de CT de 24.1 – 26.9. El examen histológico revela lesiones características de HSMI (Inflamación del Músculo cardíaco y esquelético) en todos los peces muestreados (Figura 1, A-B), por lo que se confirma caso de HSMI. Los intentos de aislamiento de PRV no resultaron al tercer pasaje en CHSE-214 y EPC. El hemograma realizado indica principalmente anemia y disminución del VCM (Tabla 1.7 y 1.8).

Corresponde al primer caso oficial de HSMI, y de acuerdo a los resultados de prevalencia de PRV en salmónes del Atlántico sanos en fase de agua dulce, la Autoridad clasifica la enfermedad HSMI en la lista 3. Para la definición de caso HSMI, es necesario análisis de RT PCR-PRV e histológico de corazón y músculo esquelético del mismo pez, no sirven los pools para establecer caso de HSMI.



**Figura 1:** (A) Caso 575-15-E. Epicarditis mononuclear difusa leve y miocarditis difusa moderada, afectando tanto la capa compacta como la esponjosa. 10X, HE. (B) Caso 577-15-E. Epicarditis mononuclear difusa severa y miocarditis difusa severa, afectando tanto la capa compacta como la esponjosa. 10X, HE.



**Figura 1:** (A) Caso 575-15-E. Miositis mononuclear difusa moderada, con moderada degeneración difusa de las fibras musculares. 40X, HE (B) Caso 577-15-E. Miositis mononuclear difusa severa, con severa degeneración difusa de las fibras musculares y reemplazo del tejido muscular por fibroblastos. 10X, HE.

**Tabla 1.5.** Valores de parámetros sanguíneos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) afectados con HSMI. Los valores del nº1 corresponde a pez sin signos clínicos, positivo a RT qPCR PRV

Identif	VGA	Hemoglobina	Eritrocitos	Leucocitos	Plaq	VCM	CHCM	PROT	Hemólisis	Ictericida
Nº	%	(g/L)	(10 <sup>6</sup> /ul)	(ul)	(10 <sup>3</sup> /ul)	(fl)	(g/L)	(g/L)		
1	57	84	1,1	8700	5300	518	147	75	++	-
2	47	92	1,2	8600	6500	392	196	75	+	-
3	30	56	1	9100	2900	300	187	40	+	-
4	39	61	0,68	6900	4400	574	156	58	+	-
5	35	77	1,5	5900	1400	233	220	45	-	+
6	23	65	0,89	12700	2300	258	283	18	-	+
7	36	78	0,71	6900	1300	507	217	50	-	+
8	45	77	0,72	12700	2400	625	171	52	-	+
9	38	61	0,63	13400	1500	603	161	45	-	+
10	50	82	0,94	18000	2000	532	164	65	-	+
11	47	73	0,96	11900	3200	490	155	52	-	+
12	40	90	1,7	11830	2600	235	225	45	-	+
13	24	50	0,36	8600	2000	667	208	20	++	
14	38	92	0,79	10940	1930	481	242	65	-	+
15	45	75	0,74	7400	1000	608	167	65	-	+

Tabla 1.6 Valores de parámetros sanguíneos (fórmula diferencial) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) afectados con HSMI. Los valores del n° 1 corresponde a pez sin signos clínicos, positivo a qPCRPRV

**Formula diferencial**

Identif.	Blastos		Heterofilos		Linfocitos		Monocitos		Observacion
	N°	%	%	ul	%	ul	%	ul	
1	0	0	10	870	87	7589	3	261	MA+,EP+
2	2	172	37	3182	51	4386	10	860	MA+,EP+
3	0	0	23	2093	61	5551	13	1183	MA+,EP+
4	0	0	13	897	60	4140	27	1883	MA+,EP+
5	0	0	32	1888	60	3540	8	472	MA+,EP+
6	0	0	28	3556	62	7874	10	1270	MA+,EP+
7	1	69	24	1656	50	3450	25	1725	MA+,EP+
8	1	127	13	1651	72	9144	14	1778	MA+,EP+,ICM+
9	0	0	7	938	27	3618	66	8844	MA+++,EP+,LR+,ICM++
10	0	0	14	2520	64	11520	22	3960	MA+,EP+,LR+
11	0	0	45	5355	47	5593	8	952	MA+,EP+,LR+
12	0	0	30	3549	63	7453	7	828,1	MA+,EP+,LR+
13	0	0	34	2924	46	3956	20	1720	MA+,EP+,LR+
14	0	0	12	1312,8	82	8971	6	656,4	MA+,EP+,LR+
15	0	0	26	1924	52	3848	22	1628	MA+++,EP+,LR++

ICM= Inclusiones citoplasmáticas en los monocitos MA= Monocitos activados

EP= Eritrocitos policromáticos LR= Linfocitos reactivos

+ = Leve ++ = Moderada +++ = Marcada.

Se realizó un seguimiento a los salmones del Atlántico diagnosticados con HSMI del primer caso oficial (Caso 025.15), en el mes de enero 2016, para aportar datos a entender la evolución de la enfermedad. Los peces moribundos mostraron lesiones macroscópicas que se visualizan en la figura 2. Al comparar los resultados de RT PCR-PRV, se detectó un aumento en el rango de CT y en el promedio de CT, lo que indicaría una disminución del RNA genómico de PRV en estos peces (Tabla 1.9).

El examen histológico confirma HSMI, con elementos celulares que indican cronicidad. Además, se detecta co-infección de PRV con Calicivirus (ASCV) en 2/9 s Atlánticos con CT de 26,67 y 31. Estos resultados se detallan en el Informe de Caso 02.16.



Figura 2.(A) Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con ascitis sero-sanguinolenta, hígado pálido y esplenomegalia. (B) Salmón del Atlántico con coágulo cardiaco, hígado pálido y branquias pálidas.

Tabla 1.7. Rango y valores de CT qPCR-PRV de salmones del Atlántico (*Salmo salar*) con HSMI del primer caso oficial y del seguimiento según fechas de muestreo

<b>Ct (15.09.16)</b>	<b>Ct (16.01.16)</b>
<b>1er caso</b>	<b>Seguimiento</b>
24,9	28,75
25,1	30,95
25,7	28,45
24,1	32,21
26,5	29,73
26,9	30,48
26,7	29,92
24,2	30,97
24,7	30,16
24,4	
26,8	
24,3	
25,1	
25,6	
24,8	
<b>24.1 - 26.9</b>	<b>28.7 - 32.2</b>
<b>25.32</b>	<b>30.18</b>

## **1.2 Resultados de casos de alza de mortalidad en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo en fase marina.**

Se presentan en anexo los Informes de los Casos 33.015 y 34.015, de los que se realizaron exámenes histológicos. En ambos casos no fue posible concluir adecuadamente el examen por la mala calidad de las muestras. Además, el Caso 35.15 para análisis de enfermedades exóticas y PRV, sospechoso de SIT (Síndrome Idiopático de la Trucha) por el edema, no se pudo confirmar, también se descarta HSMI y la sospecha de IHNV y VHSV. Se adjunta el resultado del examen histológico de estas muestras en el anexo.

No se detectó SIT (Síndrome Idiopático de la Trucha) en estos peces, con los que estaba planificado realizar los postulados de Koch, con homogenados de órganos de peces con SIT, tendiente a aportar a definir la etiología de esta grave enfermedad de la trucha, actividades relacionadas con el objetivo 1, 4.1 Peces de cultivo: inoculación experimental de enfermedad sindrómica.

## **1.3 Resultados de la detección de PRV en salmónidos silvestres**

De muestras de salmónidos de vida libre, enviadas para la confirmación de PRV/HSMI por parte del IFOP, fue posible confirmar mediante RT PCR-PRV en salmón del Atlántico, trucha arco iris y salmón coho. Se detectó en los peces de la especie *O. kisutch* alteraciones histopatológicas concordantes con las descritas para HSMI. En los salmones del Atlántico muestreados la infiltración inflamatoria detectada a nivel cardiaco es inespecífica, y no se detectó en trucha arco iris. Los resultados de RT PCR-PRV y examen histológico se presentan como informes de caso 01/15, 04/15, 26/15, 03/16, 05/16, 11/16 y 17/16 y se incluyen en anexo.

Este resultado es de interés ya que recientemente se publicó un caso de HSMI en salmones coho de cultivo, asociado a mortalidad y signos clínicos de la enfermedad. En las tablas 1.10, 1.11, 1.12 se resumen los resultados obtenidos de estas muestras según el periodo de recepción.

Tabla1.8. Número de caso, fecha de recepción, especie, cantidad y lugar de obtención de las muestras de salmónidos de vida libre, indicando resultado de RT PCR-PRV y examen histológico de HSMI durante 2015.

FECHA RECEPCIÓN	Nº DE CASO	ESPECIE	LUGAR	PCR PRV	CT	HISTOLOGÍA
05.02.2015	01.15	<i>S. salar</i>	Lago Llanquihue	<i>S. salar</i>	(1/1 +) 24,4	Corazón (1) Infiltración inespecífica
21.04.2015	04.15	<i>S. salar</i> (5) <i>O. kisutch</i> (6) <i>O. mykiss</i> (1)	s/información	<i>S. salar</i>     <i>O. kisutch</i>	(4/5 +) 30,25 22,91 32,04 32,69 (3/6 +) 33,23 26,87 31,49	Corazón (7) Infiltración inespecífica    Negativos
01.10.2015	26.15	<i>S. salar</i> (7) <i>O. kisutch</i> (1) <i>O. mykiss</i> (1)	s/información	<i>S. salar</i>       <i>O. mykiss</i>	(6/7 +) 28,9 33,9 33,5 30,5 31,8 31,9 (1/1 +) 29,6	Corazón (7) Infiltración inespecífica      Negativo

Tabla 1.9. Número de caso, fecha de recepción, especie, cantidad y lugar de obtención de las muestras de salmónidos de vida libre, indicando resultado de RT PCR-PRV y examen histológico de HSMI durante 2016.

FECHA RECEPCIÓN	Nº DE CASO	ESPECIE	LUGAR	PCR PRV	CT	HISTOLOGÍA
16.03.16	03.16	<i>S. salar</i> (2) <i>O. mykiss</i> (4)	Lago Llanquihue	<i>O. mykiss</i> 4/4 + <i>S. salar</i> 2/2 +	27,95 24,42 29,04 27,35 28,97 28,92	<i>O. mykiss</i> 4/4 <i>S. salar</i> 2/2 no concluyentes
20.04.16	05.16	<i>O. kisutch</i> (1)	Lago Rupanco	<i>O. kisutch</i> 1/1 –	sin CT	<i>O. kisutch</i> 1/1 no concluyente
24.05.16	11.16	<i>O. mykiss</i> (1) <i>O. kisutch</i> (4)	Lago Puyehue	<i>O. mykiss</i> 1/1 + <i>O. kisutch</i> 4/4 +	31,28 29,34 31,99 30,30 30,77	<i>O. mykiss</i> 1/1 <i>O. kisutch</i> 4/4 no concluyentes
08.06.16	17.16	<i>S. salar</i> (1)* <i>O. kisutch</i> (2)**	Lago Llanquihue	* <i>S. salar</i> 1/1 + ** <i>O. kisutch</i> 1/2 +	31,95 26,6	<i>S. salar</i> 1/1 : no concluyentes <i>O. kisutch</i> 1/2 : <b>Lesiones concuerdan con HSMI</b>
17.08.16	29.16	<i>O. mykiss</i> (2) <i>O. kisutch</i> (1)	Lago Colico Lago Puyehue	<i>O. mykiss</i> <i>O. kisutch</i>	(2/2+) 30,85 32,09 (1/1+) 21,49	Pendiente
07.09.16	32.16	<i>O. mykiss</i> (2)	Lago Villarica	<i>O. mykiss</i>	(2/2+) 28,94 31,60	Pendiente
29.12.16	40.16	<i>S. salar</i> (1)	Lago Llanquihue	<i>S. salar</i>	(1/1+) 28,98	Examen histológico no revela cambios tisulares de HSMI.

Tabla 1.10. Número de caso, fecha de recepción, especie, cantidad y lugar de obtención de las muestras de salmónidos de vida libre, indicando resultado de RT PCR-PRV y examen histológico

FECHA RECEPCIÓN	Nº CASO	ESPECIE	LUGAR	PCR PRV CT	HISTOLOGÍA
27.01.17	03.17	<i>S. trutta fario</i> (1)* <i>O. kisutch</i> (2)**	Fiordo Aysén (FA)*  Estuario Valdivia (E.V)**  Puerto Natales (PN)**	<i>S. trutta</i> - sin CT <i>O. kisutch</i> (2/2+) EV-05 24,38 PN-16 29,97	Examen histológico no revela cambios tisulares de HSMI
03.05.17	11.17	<i>O. kisutch</i> (1)	Canal Puyuhuapi	<i>O. kisutch</i> (1/1+) 30,94	Examen histológico no revela cambios tisulares de HSMI
05.06.17	14.17	<i>O. mykiss</i> (4) * <i>O. kisutch</i> (1)**	Estuario Valdivia (E.V)*  Puerto Natales (PN)**	<i>O. mykiss</i> (4/4 +) 26,19 32,16 27,26 21,11  <i>O. kisutch</i> (1/1+) 29,92	Examen histológico no revela cambios tisulares de HSMI

Estas detecciones de PRV, y en algunos peces salmónidos silvestres asociados a HSMI, indican la amplia distribución de PRV en el ecosistema acuático nacional, en consecuencia, es recomendable mantener una vigilancia del virus y su manifestación clínica en peces de cultivo asociada a mortalidad, evaluando si es necesario incorporar la enfermedad en la lista 2 de enfermedades del país, para establecer un programa de prevención y control.

#### 1.4 Resultados de casos sospechosos de SAV (Alfavirus de salmónidos) en trucha arcoíris en fase de agua dulce.

Se recibieron 7 casos de truchas con sospecha de SAV, al respecto, en nuestro Lab., tuvimos un Ct sospechoso utilizando el método descrito en el Manual de la OIE. De tal manera que enviamos a secuenciar todos los productos de PCR que dieron Ct. Los análisis virológicos en células susceptibles a SAV resultaron negativas, así mismo los exámenes histológicos no revelaron cambios tisulares sugerentes de SAV en todas las muestras analizadas.

La tabla 1.13 señala los resultados de la secuenciación, en donde se destaca la ausencia de coincidencia con SAV, interesantemente si con gen de hemoglobina de la trucha y gen de proteína Mx de salmón del Atlántico.

De lo anterior se concluye que los partidores descritos por la OIE tendrían un alineamiento cruzado con mRNA del hospedero.

Tabla 1.11. Resultado de la secuenciación de los productos de PCR-SAV obtenidos

BIOLOGÍA MOLECULAR				
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Secuencia obtenida.	Resultado BLAST NCBI
Caso 37/16	Secuenciación Productos PCR	2 Qnsp P-1F	GTGCACCAAGAGGTCTCAGTATAGGACACACCTGGTCTATGCCGCA CTCTCAATGACTCGCCTACATGCACCTACATGTGAGGGTGCCTTCAC CTATTTGGTCTCACCACAGGCCACACTCACCACCTGGCTACAACG CTACCCTAATCGACCGTTTTGTAGACCACACAGTTCTCCATCTTGG TCACAAATGGTGATGCCGTGCTTCTCCCTGGAGCGGAACCGGGGGC CACAGAAGCCCAGTGGGAGAAGTAGGCCTTAGTCTGGGGGTAGACT ACGAGCATCCTGAAAAGAGCCTGGTCTCCAATCTCATCGGTTTTAG GGAGGATCTTGCCCCAGATGGCCTTACGTTAGCTTCTCCAACCTT GACTACA	Oncorhynchus mykiss clone omyk-evn-514-096 Hemoglobin subunit alpha-4 putative mRNA, complete cds
		2 Qnsp P-1R	GTTTGGAGGTAGGGCTGTGTCGGTCACTTTTTCTTACATTGGTGGCT CTTTGTTGAATTCCTTCAGGGCCGGGTTCCGGCCGGCTGGCTGGTG GCCGGCCGGGGCCGGGAGATCGCTGGTTCTGGGCCGGAGGGCTAAA CCTTCATGAATCATATGGTCTTGGAATTGGCCATTACGATCCAT TTGGTTTCTTGACCGATATCAATGAAGTCCCGCCAGCAACCTGAG GGTGGACCCCACTTCAAGATCCTGGCTCACAACTAATTTGTG GTCATTGCCGCTACTTCCCTGCGGAATTTACCCCGAGATTACC TGTCCGTGGAGAAGTTCCTGCAGCAACTGGTTCAGGGCCGGA	Oncorhynchus mykiss clone omyk-evo-508-026 Hemoglobin subunit alpha-4 putative mRNA, complete cds
		9 Qnsp P-1F	GGCTATGGTGTGTCCAGTTGCCCGTCTCCGCGACTATGCCGCGG CCTGACCTTTCTCCCTCTTGTGCTACAGCATCATCCACTTGGCTCA ATTTTCCCTTGGCTACAACCTTCCATTTCTCCCAACATGTGCC TTTAGCTCGCATACAAACACGGCCTTCTCCCTCTTGGGTACATTCT ATCTACATCCCCATGGTATGTGGCTCTTTACAGTTAGCTGCCTCC TATAGCTTTCTCCACTTGGCTACACTCACGGCAGTGTGTATGTGCG GTGCTGTTGGATAGACACACGCCGGCAGCTCTTCGTTTTTTGGGA TGATCCTGCTTATATGGCCAGTCCCTCTCCTAGCTCCAACCTTC TCACACATGTAGACAAAA	No significant similarity found

		9 Qnsp P-1R	CCGGCACGGTGC GCGACGTGACTGCTGGTTCGCCCCCTCCTCCTGCC ACCTTGGCCCGGTCCTGGTGTCTCGGGCGGACGATCATGGCCTGATC TATCTTGTTC AAGCCTGGTGTTCCTTTATCCTTTATTTCCCGTTTAT GTACCTTTTGTGGGAAGTTATTGGAGACGTCTACCTGCATTCAC GGGTGAGTGACTATGTCTCACCATCTGATGTAACGGCATAAAAGT TGGAGAACTGGTTCAGGGCCGGA	No significant similarity found
		11 Qnsp P-1F	GTTTGTACAGCTCCACAGCATATGCATTGTCCCTCCCCCTACCCT CCCCCTCGTTCTCCTCCCTTTGTACACAACCCATGCCGCCCAACT GGCCACGGTGC GCTACAACCCGTAGGCAACATGCCGCCCAACTGG TTCAGGGCCCGTCCCACTTGGCTACAATTTTCATGTAAACGTATCC ATCCTCTCTCCTCCTTGAAGTAACCTCATCTCTGATCGAACACGAC TGGACTACCATTGACAACAATGTAGTAGTGTATAGTAAAGCAATAA GGCCAGAGGGGAGCTTCTCCCACTTGGCTAC	No significant similarity found
		11 Qnsp P-1R	GAAAGATATCGTTAGATCTTGCATGTGCTTATCCGCACGTTGTTTA CATTTCCTCCTGCTTTTTTGGGCCGGGAGCCTGTCCGAGGTGGTACT CTCGCTGCTGCAACTTCCCACTGGATCAGGTCCGGAATATTACAT TTCCAACTGGTTCAGGGCCGGA	No significant similarity found
		14 Qnsp P-1F	GTACCGTATGATATACGAGCCTGCCGGGGCTTACTCCTCCTGCCT ACAAGGAACAGCCTGTTGAATCCATGTTACAATCTCCTACATGATC AATAACACACCACACACTCAACATACATCAGCTGTTAAAACAATCT CTTCCAGGCTCATCACACACTGCTATGATTTTTCCACCACATTCAC CTTTCATACGTAGCTTCTCCCACTTGGCTACCATCTATCTGCTCCT ATCATAGCTCTCTCCCACTTGCACCTACCAAGCAGACTGACCGACGA TTCCAACAGAGAAGACAACAACATACGGGCGTAAATGTATGCATTG CAATTTATTTACAATGAGCGGCCGTTTCATGTGCAAAGGATTAGCAT TTCAATTAATATAAATTATCAACTGGTTCAGGGCCGG	PREDICTED Salmo salar interferon- induced GTP-binding protein Mx-like (LOC106586887), Mrna
		14 Qnsp P-1R	GAGCCCGGATTAGACTGTTCTTGCCTATCTTCCCGGGTCCGACA GATTCCTGCAACTGGTTC AATCCCGGCTGACTTTGCGCGTCTCGG CAGGTGCTGGTTCACGGGCGGATGACACATAGAAGCTTCTGAACT GGAGGAGATGAAGAATAGAGCTGAGGAGGAACCCAAGGAGGGGATG AGTTACTTGAGAACTGGTTCAGGGCCGGAACATATATTATACATCTG ACGGTTCAGCGCCTGGTCTTACTTGTGTTGATTTTTTACTTAATGAC CTGCACGAGGAGGACATTCGTACTGCCAACTGGTTCAGGGCCTCT TACCATATTGCTGCTTTTGTATATGGAATGGAACGGGGTCCGGGCG	No significant similarity found.
		19 Qnsp P-1F	GGTCACAGTGGTGT CATGGATCCTGTGACGACTCCCATGCGCTG GTTGAGCACAGCTCCTGTTGGCTTCACTGAGTTCACGTACGCTTTC ATTTCTTGGCTACAGAACAAAATCCATTTCTCCCACTTGGCTACAT GAGATTTCTCCACATGCTTAGCAGATATTTTTTTACAGCTTTCTC CCACTTGGCTACA	No significant similarity found.
		19 Qnsp P-1R	CGAACTGGATT CATGCCATTGCTGACCTCACTTATTGATGTGTTAT CTTAGTTTTTTTTGGTTTATGCCTCATGGCCACTAGCTAGTCACAA CTGGTTCCTGGCCCGAGTCCGGAACCTGGTTCAGGGCCGGACAAAT GGAATCTGCTATGCAACAGAATACCCTGGAGGAACTGGTTCAGG GCCGGA	No significant similarity found.
		27 Qnsp P-1F	CCCTCCTGGACTTGGCGGTTTGGAGCTTATCTTCCGCCTGTGAT CCAGGCCGAGCTTGTCTCCCACTTGGCTACAGCAGCAGCTCCGAG CTTTCTCCCACTTGGCTACAGGGTAGACATCACAGCTTTCTCCAC TTGGCTACTCTGATCTGAACACACACACCAGTACCTCCCTACATTC TGATCTGACACACACACACACACACACCAGTACCTCCCTACATTC GATCTGAACACACACACACACACACACACCAGTACCTCCATACTTTGT GATGTGAACACACACACACACACACGCTTATCTTTATTTTCTAATCC CATGTATCCCTCCAGAGCTCTCTCCCGTGTGGACACA	No significant similarity found.
		27 Qnsp P-1R	NNNNN	No significant similarity found.

Fecha de inicio ensayos: 26/12/2016

Fecha término ensayos: 28/12/2016

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

Secuenciación capilar de Sanger en instrumento ABI 3500 de Applied Biosystem, programa Sequencing Analysis.

Empresa Austral-Omics

**OBSERVACIONES:**

Las muestras (6) fueron secuenciadas en sentido forward y reverse usando los primers Qnsp P-1F y Qnsp P-1R dando dos secuencias por muestra, en un total de 12 reacciones.

**1.5 Resultados de muestras de Trucha arco iris (*O. mykiss*) sospechosas de NGD****(Enfermedad Nodular Branquial).**

Se realizó visita a petición de la Autoridad sectorial, acompañado por funcionarios de Sernapesca, para la toma de muestras de truchas arco iris de dos pisciculturas ubicadas en el área de Melipeuco, cuya fuente de agua son ríos asociados a la hoya hidrográfica del río Allipen, sospechosas de Enfermedad Nodular Branquial, que se describe asociada a la presencia en branquias de amebas de agua dulce. Los exámenes realizados en los dos casos, revelan clínicamente áreas de decoloración branquial, algo de palidez branquial, e histológicamente cambios tisulares sugerentes de amebiasis. Esta condición fue confirmada histológicamente por Lab de la Red de Sernapesca (Fish Vet) como NGD. Se está realizando secuenciación masiva por Lab ADL para determinar qué tipo de ameba está asociada a estos casos.

**1.6 Resultados de la prevalencia de ASCV (Calicivirus de salmón del Atlántico) en salmón del Atlántico en fase de agua dulce.**

Se incorporó esta actividad para determinar la posible co-infección de los peces con este virus, que fue detectado por primera vez por el Lab. ADL, en un caso de salmones del Atlántico en fase marina afectados con un síndrome hemolítico-ictérico. En Noruega se ha detectado en concomitancia con peces cursando HSMI, por eso el interés de determinar la prevalencia de ASCV en la producción salmón del Atlántico de agua dulce. Los resultados en peces de muestreo al azar indican que la prevalencia promedio es de 20,83% (70/336). Desagregando los datos encontramos que la prevalencia en alevines es de 4,76% (6/126), en pre smolt corresponde a 17,46% (22/126) y en smolt la prevalencia es de 50% (42/84) (Tabla 1.14).

La prevalencia en la detección del virus mediante RT PCR-ASCV, se va incrementando hasta ser mayor en el estado de smolt. No se encontraron signos clínicos, macroscópicos y microscópicos sugerentes de enfermedad asociada.

Tabla 1.12. Prevalencia de ASCV según estadio de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) muestreados al azar en fase de agua dulce.

Estadio	Casos	Prevalencia
Alevín	6/126	4,76%
Pre Smolt	22/126	17,46%
Smolt	42/84	50%
General	70/336	20,83%

### Conclusiones según Objetivo específico 1

- Existe una alta diseminación de ASCV y de PRV a nivel de centros y especímenes de *Salmo salar* en la fase de agua dulce, con prevalencias crecientes desde las etapas de alevín, pre smolts a smolts.
- Existe una diseminación geográfica de ASCV y PRV concentradas principalmente en las zonas de mayor producción de smolts.
- Se detecta PRV en salmones del Atlántico, salmón coho y trucha arcoíris silvestres sanos mediante RT PCR-PRV.
- Se detectan salmones coho silvestres con HSMI por primera vez en el país.

### Referencias

- Barry T., Powell R., Gannon F. (1990). A general method to generate DNA probes for microorganisms. *Biotechnology*, 8, 233-236.
- Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S., Bult, C. and Fields, C. (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 595-599.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Hansson, I., Persson, M., Svensson, L., Olson, Engvall, E. and Johansson, K. (2008). Identification of nine sequence types of the 16S rRNA genes of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isolated from broilers. *Acta Vet. Scan.*, 50, 10.

Mikalsen A., P. Nilsen, M. Froystad-Saugen, K. Lindmo, T. Eliassen, M. Rode, O. Evensen (2014). Characterization of a Novel Calicivirus causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Proposal for a New Genus of *Caliciviridae*. *PLoS ONE* 9(9): e107132. Doi:10.137.

## **Objetivo específico 2a: Estudio epidemiológico de Piscine Reovirus/HSMI, en reproductores y alevines, presmolts y smolts de salmón del Atlántico.**

### **2.a.1 Antecedentes de Piscine Orthoreovirus (PRV)**

Piscine orthoreovirus (PRV) es un virus recientemente descrito (Palacios et al 2010) asociado a la enfermedad inflamación del músculo esquelético y cardiaco (HSMI). Pertenece a la familia *Reoviridae*, nombre que deriva de *respiratory enteric orphan*, siendo considerados como “huérfanos” por encontrarse en tractos respiratorios y gastrointestinales, pero no asociados a enfermedades (Sabin 1959).

La familia *Reoviridae* está compuesta por 15 géneros y dividida en dos subfamilias. La subfamilia *Spinareovirinae* (contiene espinas o torretas en cada uno de los doce vértices del virus o núcleo) y *Sedoreovirinae* (no contiene proyecciones en superficie, con apariencia esférica o suavizada) (Attoui et al 2011).

Piscine orthoreovirus se encuentra altamente distribuido en salmón del Atlántico, presente en trucha y salmón coho y en distintas especies marinas (Palacios et al 2010, Garseth et al 2013a, b, Godoy et al 2016), detectado en distintos países productores de salmónidos como Noruega, Canadá, Irlanda, Dinamarca, USA y Chile (Kibenge et al 2013, Rodger et al 2014, Kibenge and Godoy 2016, Garver et al 2016).

### **2.a.2 Etiología**

Los reovirus son icosaédricos pero tienen apariencia esférica, son de tamaño entre 60 a 85 nm de diámetro, sin envoltura y poseen entre una a tres capas concéntricas de proteínas de cápside que rodean los segmentos dsRNA lineales de genoma viral (Attoui et al 2011).

Piscine orthoreovirus posee 10 segmentos de RNA doble hebra, tres segmentos L, tres segmentos M y cuatro segmentos S. Todos los segmentos génicos contienen los nucleótidos terminales 3' (UCAUC-3', comunes para orthoreovirus y aquareovirus) pero los nucleótidos terminales 5' son únicos (5'-GAUAAA/U) (Palacios et al 2010, Attoui et al 2011, Kibenge and Godoy 2016).

Kibenge et al (2013) usando análisis filogenético agrupó los aislados noruegos de PRV en el genotipo I, los aislados canadienses de PRV fueron agrupados en el subgenotipo Ia y los aislados chilenos en el subgenotipo Ib. Las cepas de PRV de salmón coho son más diversificadas genéticamente,

clasificando algunas de ellas en el genotipo Ia y otras Ib, así como en el genotipo II junto con el virus PRV-like asociado a trucha arcoíris en Noruega (Olsen et al 2015, Godoy et al 2016).

### **2.a.3 Patogenia**

Los reovirus replican en el citoplasma celular y al igual que los virus de genoma con sentido negativo y cadena simple de RNA, transportan sus propias enzimas para replicación, debido a que la célula huésped carece de enzimas para realizar mRNA de estos genomas (Kibenge and Godoy 2016). La replicación de los reovirus produce la generación de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (viroplasmos), siendo estos sitios de replicación y de ensamblaje viral (Shao et al 2013). El virus se libera por medio de lisis celular o por gemación (budding). Los géneros *Orthoreovirus* y *Aquareovirus* son los únicos ejemplos conocidos de virus no envueltos que inducen la formación de sincicios en las células infectadas, para el caso de PRV aun perteneciendo al género *Orthoreovirus*, corresponde a un virus no fusogénico (no produce sincicios) (Kibenge and Godoy 2016).

PRV se asocia a HSMI (Palacios et al 2010), demostrándose la presencia del virus en el curso de la enfermedad mediante inmunohistoquímica (Finstad et al 2012). Recientemente se demostró que los eritrocitos son las principales células blanco en la infección por PRV (Finstad et al 2014), generando cuerpos de inclusión similares a los cuerpos de inclusión descritos en el síndrome de cuerpos de inclusión eritrocitarios (EIBS). Últimamente se ha descrito la presencia de otros virus simultáneamente con PRV en salmón del Atlántico que manifiestan HSMI, quedando en duda el agente causal de HSMI (Mikalsen et al 2014). Además del hallazgo de PRV en puntos de melanina en músculo esquelético blanco de salmón del Atlántico (Bjørngen et al 2015).

Piscine orthoreovirus (PRV) se transmite de forma horizontal, la cual se ha confirmado por estudios experimentales de cohabitación (Kongtorp et al 2004b, Kongtorp and Taksdal 2009). La transmisión vertical aun cuando esta poco estudiada, no es la principal ruta de transmisión (Wiik-Nielsen et al 2012).

La manifestación clínica de la enfermedad se presenta entre 5 a 9 meses posterior al ingreso de los peces a agua de mar. En Chile se presentó un caso de HSMI durante 2015, considerado el caso oficial, donde se asoció la presencia de PRV mediante qPCR, además de las alteraciones histológicas de la enfermedad, que fueron descritas por Kongtorp and Taksdal (2009). Los signos externos e internos pueden incluir palidez cardiaca con pérdida de textura, hemorragia pericárdica, hemopericardio, hepatomegalia, hígado pálido amarillento, hígado en nuez moscada, hemorragias petequiales en

hígado, exudado fibrinoso que cubre la superficie hepática, esplenomegalia, ascitis, hemorragias petequiales en grasa perivisceral y branquias pálidas, escamas erizadas, exoftalmia, hemorragias petequiales en vejiga natatoria e ictericia (Kongtorp et al 2004a, 2006, Ferguson et al 2005, Watanabe et al 2006, Kibenge and Godoy 2016 Godoy et al 2016).

#### **2.a.4 Prevalencia de *Piscine reovirus* (PRV) en salmón del Atlántico**

**2.2.1 Alevines, pre-smolts y smolts**

**2.2.2 Reproductores**

#### **Prevalencia de PRV en Alevines, pre-smolts y smolts de salmón del Atlántico.**

##### **- Determinación del tamaño de la muestra**

##### **- Antecedentes previos**

De dos estudios realizados en Chile en centros de mar, se determinó que PRV se encuentra presente en la especie *Salmo salar* en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes en fase marina de cultivo. Por otro lado, de los 28 centros seleccionados en el estudio, 20 presentaron resultados positivos a RT PCR para PRV, lo que corresponde al 72% de los centros muestreados. En los peces se detectó *Piscine Reovirus*, y no se logró determinar la presencia de lesiones ni mortalidad asociada a HSMI. Es necesario determinar la prevalencia de PRV/HSMI en la fase de agua dulce de salmón del Atlántico y relacionar condiciones de cultivo que expliquen la alta prevalencia detectada en la fase marina.

##### **- Diseño del estudio**

Se realizó un estudio observacional de tipo transversal en pisciculturas con *S. salar* en etapa de agua dulce de peces sanos y de muestreo al azar.

##### **- Detección de la infección y enfermedad**

Se seleccionaron peces del grupo etario desde alevín hasta smolt de la especie *Salmo salar*, considerados para este estudio como susceptibles. A las muestras obtenidas de forma individual se realizó en el laboratorio la técnica de RT PCR-PRV para detectar la presencia de *Piscine Reovirus* (PRV).

### - Población en estudio

De una población de 93 pisciculturas activas al momento de muestreo, 50 de ellas presentaron *S. salar* en etapas de producción desde alevines a smolts, cuyas producciones van desde 8.296 a 8.953.670 unidades, con sistemas de producción en flujo abierto y recirculación. De los 50 centros, 31 presentaron peces en etapa de producción de presmolt y smolts (tabla 2a1 y figura 2a1).

Tabla 2a.1. Distribución de los centros con *Salmo salar* para la determinación de infección por PRV según región.

Región	Nº de centros	%
Metropolitana de Santiago	1	2
Maule	2	4
Bío-Bío	2	4
La Araucanía	16	32
Los Ríos	4	8
Los Lagos	23	46
Aysén	1	2
Magallanes	1	2
Total	50	100

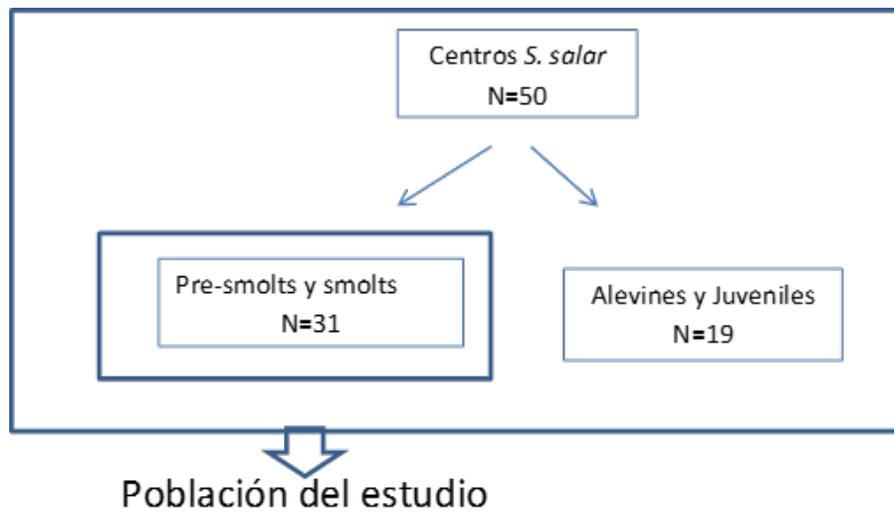


Figura 2a.1. Población de *Salmo salar* y subpoblaciones según nivel de desarrollo en la población en estudio.

## **- Muestreo**

### **- Criterios de inclusión de los centros**

Se seleccionaron 31 centros activos con una población igual o superior a 200.000 especímenes de salmón del Atlántico pre smolts - smolts, ubicados en las regiones: Maule, Bío-Bío, Araucanía, Los Ríos, Los Lagos y Aysén. Se realizó el muestreo en la totalidad de los centros (31) para representar la situación de infección en el país.

### **-Muestreo de peces**

Se realizaron dos tipos de muestreos de peces: uno aleatorio individual de 12 especímenes y otro dirigido, en pools de 3 con manifestaciones de enfermedad indeterminada.

Para determinar el número de muestras, se realizó una revisión bibliográfica sobre la detección del virus Piscine Reovirus y la enfermedad HSMI en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) tanto en mar como agua dulce, y como resultado de las investigaciones publicadas, sólo se ha diagnosticado la infección por este virus en peces transferidos en agua salada (mar). Debido a estos resultados, se decidió establecer un tamaño de muestra para la detección de la infección con baja prevalencia o detección de infección del virus:

Componentes de la fórmula: se estableció una prevalencia esperada de un 1,5%  $\pm$  error 1,24% y un 95% de nivel confianza asumiendo una población infinita.

**-Tamaño muestral obtenido:** de 372 especímenes (se agregó de 1 a 2 peces por centro debido a posibles pérdidas de muestras al llegar al laboratorio), obteniéndose por centro 12 peces individuales y 2 pools de 3 peces por centro (total 60 pools) con manifestaciones de enfermedad ya sea orillados o mortalidad fresca.

### **- Análisis de los datos**

Con los resultados obtenidos en el estudio, se determinó las prevalencias de los centros y peces muestreados. Se realizó un análisis epidemiológico descriptivo, donde se utilizaron los programas estadísticos R<sup>®</sup> Commander, StatCalc y Excel<sup>®</sup> 2010.

## Prevalencia de PRV en reproductores de salmón del Atlántico.

### - Determinación del tamaño de la muestra

De los datos enviados por SERNAPESCA, que resume los centros activos con reproductores de *Salmo salar* para la temporada 2016, se determinó una población en estudio de 179.119 reproductores, sin distinción de sexo.

Los centros pertenecientes a 14 pisciculturas, distribuidos en 3 regiones, de La Araucanía, Los Lagos y Magallanes, se señalan en la Tabla 2a.2. La región de Aysén no presentó centros con reproductores.

Tabla 2a.2 Código de Centros y población de reproductores de *Salmo salar* temporada 2016 según Región

Código Centro	Región	Número Reproductores
90055	IX	8.464
90062	IX	30.651
90106	IX	981
90133	IX	161
90142	IX	5.494
100224	X	1.952
100356	X	2.235
100368	X	45.928
101892	X	1.469
102364	X	11.424
102683	X	24.035
103387	X	3.654
103645	X	40.487
120035	XII	2.184
Centros	14	179.119

Se utilizó la fórmula para determinación del tamaño de la muestra considerando:

#### Tamaño de la Muestra.

- **Fórmula:**

$$\text{Población finita: } n = Z^2 p * q N / e^2 (N-1) + Z^2 p * q$$

n = tamaño de la muestra

N= Población o Universo

Z=nivel de confianza 95%

p=prevalencia

q=1-p

e=error muestral

Para una población finita de 179.119 reproductores, con prevalencia supuesta del 50% (nivel utilizado cuando se desconoce la prevalencia y asume máxima variabilidad), un error en torno a la prevalencia de un 4,3%, y considerando un nivel de confianza del 95%, se obtiene un tamaño de 520 reproductores a muestrear.

#### **- Metodología de muestreo**

Para determinar la prevalencia de PRV a nivel poblacional, se recomienda obtener muestras de 38 reproductores por centro activo (37,14 muestras x 14 centros activos= 520).

#### **- Muestras analizadas**

Si bien se estableció un tamaño muestral, se trabajó con las contra muestras del *screening* de reproductores, información que se presenta en la tabla 2a.3 donde se detallan las muestras recibidas, rechazadas y analizadas de reproductores de salmón del Atlántico temporada 2015-2016 para el diagnóstico mediante RT qPCR PRV.

Tabla 2a.3. Muestras de reproductores de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) según número de caso para el diagnóstico de PRV. Se indican las muestras rechazadas y degradadas que no se analizaron.

N° Caso	Muestras rechazadas*	Total Muestras analizadas	Muestras degradadas**
20-16	0	38	1
21-16	0	38	33
22-16	0	38	0
23-16	0	38	0
24-16	0	38	0
25-16	0	38	0
26-16	0	38	0
27-16	111	3	3
Total muestras	111	269	37

(\*) Las muestras rechazadas no fueron utilizadas para el estudio por encontrarse en malas condiciones

(\*\*) Las muestras degradadas fueron declaradas como tales tras amplificación del gen constitutivo y no se utilizaron para diagnóstico

#### - Determinación de la prevalencia de reproductores infectados por PRV

Para determinar la prevalencia de PRV en reproductores se utilizaron las siguientes fórmulas.

$$\text{Prevalencia de la infección de PRV reproductores} = \frac{N^{\circ} \text{ de reproductores infectados}}{N^{\circ} \text{ total de reproductores}} \times 10^n$$

Para la determinación del intervalo de confianza de la prevalencia a nivel poblacional se utilizó la siguiente fórmula:

$$\hat{p} \pm 1,96 \left( \sqrt{\frac{\hat{p}(1 - \hat{p})}{n}} \right)$$

P=prevalencia de PRV en reproductores

Z=1,96 con 95% confianza para la distribución normal

n= tamaño de la muestra

**Estudio epidemiológico: determinación de factores de riesgo y protectivos asociados a la infección por Piscine reovirus (PRV) en salmón del Atlántico en la fase de cultivo de agua dulce.**

**Análisis de factores de riesgo asociados a la infección por PRV.**

En los centros con diagnóstico de infección por PRV, se mostrarán los resultados obtenidos por cada región, los que se representarán por su valor absoluto y porcentaje. Para las variables que tengan distribución continua, se utilizará un análisis de varianza para comparar los valores. En el caso de no presentarse una distribución normal, se utilizará una prueba no paramétrica. Para las variables que sean de tipo discreta, se utilizará un análisis Linear Mixed Model GLIMMIX de medidas repetidas y como factor aleatorio el centro anidado dentro de región. Se ha considerado un nivel de significancia del 5%.

Para los factores de conocimiento de la enfermedad, relativos a los centros y manejos de los peces, se compararán las proporciones con prueba de Chi-cuadrado. Se seleccionará la información que permitirá analizar las variables independientes o explicativas y la variable respuesta infección PRV, que está dada por la presencia o ausencia (sí o no) de por lo menos un pez con diagnóstico de la infección por la técnica de RT PCR.

Para la interpretación del modelo, las variables incluidas, se analizará la OR para cada variable, también se evaluarán las interacciones entre las variables y la posible existencia de variables de tipo confuso, el criterio de interpretación de las odds ratio se presentan en la tabla 2a.4.

**Tabla 2a.4. Valor de interpretación de las Odd Ratio del modelo**

<b>Valor OR</b>	<b>Interpretación</b>
OR<1	Factor de protección
OR=1	No hay factor de riesgo
OR>1	Factor de riesgo

## Resultados

### Estudio epidemiológico de Piscine Reovirus (HSMI), en el territorio nacional

#### Prevalencia de PRV en reproductores

Para la determinación de la prevalencia a nivel de reproductores se evaluaron un total de 235 individuos de 8 centros. La prevalencia del muestreo fue de un 40,4% y a nivel poblacional se estima con un 95% de confianza que se encuentra entre un 34% a un 45%, lo que indica una alta infección a nivel de reproductores (Figura 2a.2). La infección fue detectada tanto en centros de las regiones de La Araucanía, Los Lagos y Magallanes

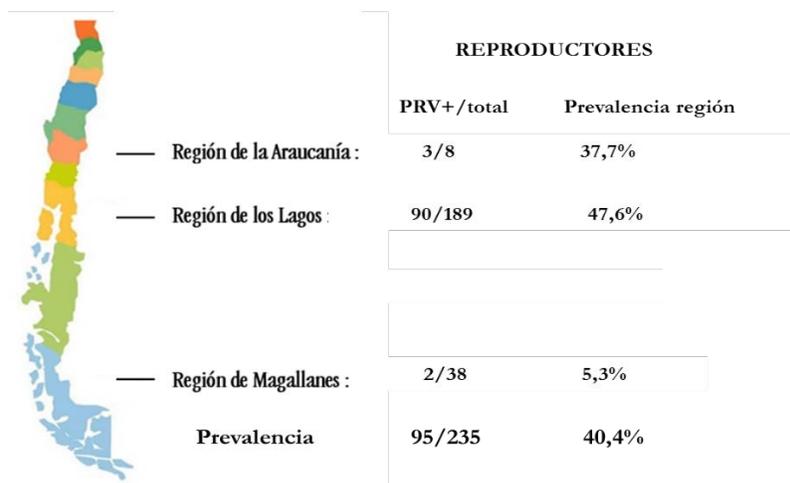


Figura 2a.2. Distribución espacial de los centros del estudio y la detección de PRV en reproductores.

#### Prevalencia de PRV en alevines, pre-smolts y smolts de salmón del Atlántico.

De 31 centros estudiados con *S. salar* en etapa de presmolt y smolt se determinó que el 74,19% (n=23) presentó peces con *Piscine Reovirus* (PRV). A nivel de peces muestreados sin manifestaciones clínicas, de un total de 372 se diagnosticó la presencia del virus en 176 especímenes lo que corresponde al 47,3%. Adicionalmente, de los 12 peces muestreados en cada centro, se estableció que en 13 centros, sobre el 50% de los especímenes presentaron infección por PRV (figura 2a.3).

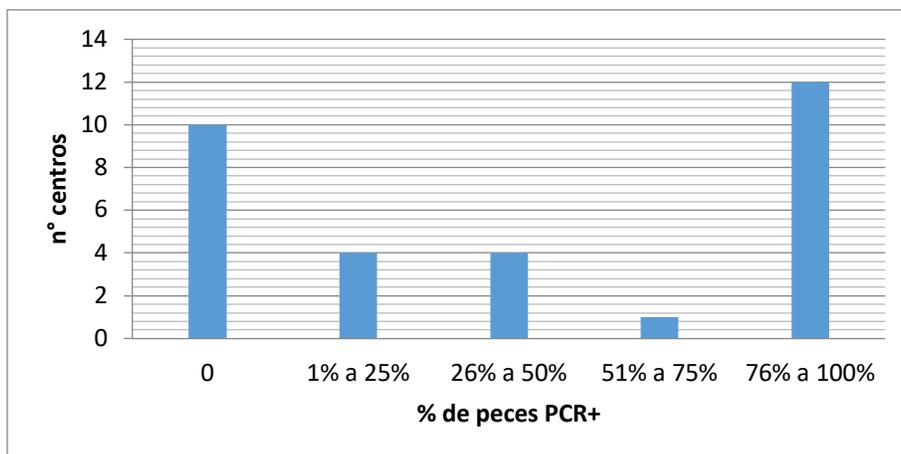


Figura 2a.3. Porcentaje de infección de PRV en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de muestreo al azar por centro.

Del estudio de los peces con manifestaciones clínicas de enfermedad (orillados o moribundos) se determinó la detección del virus en el 62% del total de pooles, y solo en 8 centros no se detectó el virus PRV.

Al comparar los pesos de los salmones del Atlántico analizados, se observó que en los centros negativos los peces tenían un peso promedio inferior (media 57,4 g. DS 21,8) a los peces de los centros con infección, aunque, como se observa en la tabla 2a.5, ambos grupos presentaron una mediana de 52,9.

Tabla 2a.5. Caracterización del nivel de infección de los centros de agua dulce estudiados según porcentaje de infección y pesos medidos.

Nivel de PRV + o -		
Variable	PRV -	PRV +
N° centros	8	23
% PCR+ min-máx.	0	1,0%-100%
<b>Pesos</b>		
Media ± Ds.	57,4±21,8	68,0±33,5
Min.-máx.	44-89	38-108,9
<b>Mediana</b>	52,9	52,9

### - Distribución geográfica

Las muestras provenían de centros de agua dulce ubicados desde la región del Maule hasta Aysén, en 5 de las 6 regiones se detectó la infección. En los centros de las regiones con especímenes en la etapa de presmolts y smolts al momento del estudio solo en Aysén no se detectó el virus, esto no significa que no esté presente, la no detección puede ser debido a que solo se muestreo un centro, que se encontraba activo al momento del muestreo (Tabla 2a.6).

Tabla 2a.6. Distribución geográfica de los centros muestreados de salmón del Atlántico y su condición de infección por PRV.

	PRV+		PRV-		
Región	n°	%	n°	%	Total
Maule	2	8,7	0	0	2
Bío – Bío	2	8,7	0	0	2
Araucanía	7	30,4	1	12,5	8
Los Ríos	1	4,3	1	12,5	2
Los Lagos	11	43,8	5	62,5	16
Aysén	0	0	1	12,5	1
Total	23	100	8	100	31

### - Flujo y origen del afluente

Al analizar el tipo de flujo se estableció la presencia del virus PRV tanto en pisciculturas de flujo abierto como en recirculación. Se observó en flujo abierto una mayor prevalencia por centro 69,5% (16), pero al compararlas con la prevalencia de los centros de recirculación estas diferencias no fueron significativas (tabla 2a.7).

Tabla 2a.7. Frecuencia de infección de PRV en salmón del Atlántico según tipo de flujo de los centros de agua dulce.

Flujo	RT PCR +	%	RT PCR -	%	Total
Abierto	16	69,5	5	62,5	34
Recirculación	7	30,5	3	37,5	16
Total	23	100,0	18	100	50

Chi<sup>2</sup> p=0,8

En relación al origen del afluente, se detectó el virus PRV tanto en centros que se abastecen de aguas profundas como superficiales, si bien existe una mayor frecuencia en centros de aguas superficiales estas diferencias no fueron significativas (tabla 2a.8).

**Tabla 2a.8. Frecuencia de infección de PRV según tipo de afluente de los centros de agua dulce de salmón del Atlántico.**

<b>Afluente</b>	<b>PRV+</b>	<b>%</b>	<b>PRV-</b>	<b>%</b>	<b>Total</b>
Superficial	13	56,5	5	62,5	18
Profundo	10	43,5	3	37,5	13
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	<b>31</b>

Chi<sup>2</sup> p=0,4

### **Factores de riesgo asociados a la infección por PRV en alevines, presmolts y smolts.**

Para la determinación de factores de riesgo y de protección, se evaluaron 11 variables que se presentan en la tabla 2a.9, estas variables están referidas a las características de los peces, condiciones ambientales en relación a la fuente de agua y área geográfica, y se incluyó la presentación de otras enfermedades.

**Tabla 2a.9. Frecuencias de variables independientes del modelo de GLIMMIX**

<b>Factores categóricos</b>	<b>Categoría</b>	<b>n°</b>	<b>%</b>
<b>1.-Características de los peces</b>			
Población Inicial en Riesgo	≥ 1.548.515	406	58
	<1.548.515	294	42
Etapa de Incubación	Ejecución	322	46
	Sin Ejecución	378	54
Etapa de Desarrollo	Alevín-juvenil	266	38
	Pre smolt-smolt	434	62
Estado Nutricional	Regular	196	28
	Bueno	504	72
<b>2.-Condiciones de la fuente de agua</b>			
Fuente de Afluente	Ríos	350	50
	Otros	350	50
Sistema de Flujo	Abierto	476	68
	Recirculación	224	32
<b>3.-Área geográfica</b>			
Zona Geográfica	Sur	406	58
	Centro Sur	294	42
<b>4.-Otras enfermedades</b>			
Micosis	Con inf. centro	560	80

	Sin inf. centro	140	20
Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD)	Con inf. centro	70	10
	Sin inf. centro	630	90
Flavobacteriosis	Con inf. centro	420	60
	Sin inf. centro	280	40
Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)	Con inf. centro	210	30
	Sin inf. centro	490	70

De acuerdo al análisis de los factores de riesgo y de protección (Tabla 2a.10), frente a la infección por PRV en alevines y smolts, se determinó que los centros con mayor población de alevines y juveniles, así como aquellos que utilizan flujo abierto frente a los de recirculación, fueron identificados como factores de protección. Se identificaron que los peces con pesos superiores a 56 g, presentaron 2 veces más posibilidades de tener infección por PRV, así como también aquellos centros que se abastecen de agua de río y presentan infecciones concomitantes por BKD. Finalmente se determinó que los peces provenientes de la región de La Araucanía, poseen 3 veces más posibilidades de presentar la infección que los de origen de la región de Los Lagos.

**Tabla 2a.10. Factores de riesgo y de protección del Modelo final de GLIMMIX**

Factores	Categoría	Frecuencia	OR	IC 95%		Valor-p
				Inferior	Superior	
Población inicial	≥ 1.548.515	406	0,58	0,38	0,91	0,01
	< 1.548.515	294				
Peso gr	≥56 gr	342	2.04	1,3	3,0	0,0004
	<56 gr	358				
Fuente de afluente	Ríos	350	1,78	1,13	2,81	0,0117
	Otros	350				
Sistema de Flujo	Abierto	476	0,28	0,16	0,47	<0,0001
	Recirculación	224				
Zona Geográfica	Araucanía	224	3,08	2,36	6,13	<0,0001
	Los Lagos	322				
Enf. bacteriana del riñón (BKD)	Positivo	70	16,1	5,8	44,4	<0,0001
	Negativo	630				

## Conclusiones del estudio epidemiológico de PRV

- Existe una alta diseminación del virus Piscine Reovirus (PRV) a nivel de centros y especímenes de salmón del Atlántico en centros de cultivo en agua dulce, especialmente en las etapas de pre smolts y smolts.
- Existe una diseminación geográfica de PRV, que se concentra principalmente en las zonas de mayor producción de smolts.
- Se detectó el virus PRV en sistemas de flujo abierto y cerrado, así como en pisciculturas que se abastecen de fuentes de aguas profundas como superficiales.
- Se detecta PRV en salmones del Atlántico, salmón coho y trucha arcoíris silvestres sanos mediante RT PCR-PRV.
- Se detectan salmones del Atlántico con HSMI oficialmente por primera vez en el país, asociados a mortalidad en el inicio de la fase marina de cultivo.

## Referencias

Attoui H, Mertens PPC, Becnel J, et al (2011) Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The 9th Report of the ICTV (2011) - Reoviridae.

Bjørngen H, Wessel Ø, Fjellidal PG, et al (2015) Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet Res* 46:89. doi: 10.1186/s13567-015-0244-6

Ferguson HW, Kongtorp RT, Taksdal T, et al (2005) Short communication An outbreak of disease resembling heart and skeletal muscle inflammation in Scottish farmed salmon, *Salmo salar* L., with observations on myocardial regeneration. 119–123.

Finstad ØW, Dahle MK, Lindholm TH, et al (2014) Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Vet Res* 45:35. doi: 10.1186/1297-9716-45-35

Finstad OW, Falk K, Løvoll M, et al (2012) Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Vet Res* 43:27. doi: 10.1186/1297-9716-43-27

Garseth ÅH, Ekrem T, Biering E (2013a) Phylogenetic Evidence of Long Distance Dispersal and Transmission of Piscine Reovirus (PRV) between Farmed and Wild Atlantic Salmon. *PLoS One* 8:1–

12. doi: 10.1371/journal.pone.0082202

Garseth ÅH, Fritsvold C, Opheim M, et al (2013b) Piscine reovirus (PRV) in wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and sea-trout, *Salmo trutta* L., in Norway. *J Fish Dis* 36:483–493. doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01450.x

Garver KA, Marty GD, Cockburn SN, et al (2016) Piscine reovirus, but not Jaundice Syndrome, was transmissible to Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), Sockeye Salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), and Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 39:117–128. doi: 10.1111/jfd.12329

Godoy MG, Kibenge MJT, Wang Y, et al (2016) First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV. *Virology* 13:98. doi: 10.1186/s12985-016-0554-y

Kibenge FSB, Godoy MG (2016) Aquaculture virology. American Press, London, UK

Kibenge MJT, Iwamoto T, Wang Y, et al (2013) Whole-genome analysis of piscine reovirus (PRV) shows PRV represents a new genus in family Reoviridae and its genome segment S1 sequences group it into two separate sub-genotypes. *Virology* 10:230. doi: 10.1186/1743-422X-10-230

Kongtorp RT, Halse M, Taksdal T, Falk K (2006) Longitudinal study of a natural outbreak of heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 29:233–44. doi: 10.1111/j.1365-2761.2006.00710.x

Kongtorp RT, Kjerstad a, Taksdal T, et al (2004a) Heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L: a new infectious disease. *J Fish Dis* 27:351–8. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00549.x

Kongtorp RT, Taksdal T (2009) Studies with experimental transmission of heart and skeletal muscle inflammation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 32:253–62. doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.00983.x

Kongtorp RT, Taksdal T, Lyngøy a (2004b) Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aqua Org* 59:217–24. doi: 10.3354/dao059217

Mikalsen AB, Nilsen P, Frøystad-Saugen M, et al (2014) Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Proposal for a New Genus of

Caliciviridae. doi: 10.1371/journal.pone.0107132

Olsen AB, Hjortaa M, Tengs T, et al (2015) First Description of a New Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) Similar to Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) and Detection of a Gene Sequence Related to Piscine Orthoreovirus (PRV). *PLoS One* 10:1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0131638

Palacios G, Lovoll M, Tengs T, et al (2010) Heart and skeletal muscle inflammation of farmed salmon is associated with infection with a novel reovirus. *PLoS One* 5:e11487. doi: 10.1371/journal.pone.0011487

Rodger HD, McCleary SJ, Ruane NM (2014) Clinical cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 37:935–939. doi: 10.1111/jfd.12186

Sabin AB (1959) Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* 130:1387–1389.

Shao L, Guo H, Yan L-M, et al (2013) Aquareovirus NS80 Recruits Viral Proteins to Its Inclusions, and Its C-Terminal Domain Is the Primary Driving Force for Viral Inclusion Formation. *PLoS One* 8:1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0055334

Watanabe K, Karlsen M, Devold M, et al (2006) Virus-like particles associated with heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Dis Aqua Org* 70:183–92. doi: 10.3354/dao070183

Wiik-Nielsen CCR, Løvoll M, Sandlund N, et al (2012) First detection of piscine reovirus (PRV) in marine fish species. *Dis Aqua Org* 97:255–258. doi: 10.3354/dao02425

## **Objetivo específico 2b: Estudio de la coinfección IPN-PRV-CLV en reproductores y juveniles – smolts de salmón del Atlántico.**

### **Antecedentes**

Las coinfecciones virales son un fenómeno común tanto en mamíferos como en peces (Rodríguez et al 2005, Tao et al 2007), y establecer las distintas coinfecciones y verificar su impacto en la salud de los organismos vivos es importante, principalmente porque no sólo dificultan la recuperación del hospedero, sino también crean confusión y retraso en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades (Eswarappa et al 2012).

### **Metodología**

Las muestras de salmónes del Atlántico provenientes de agua dulce fueron extraídas desde 24 centros de cultivo (Pisciculturas) localizadas en las regiones Metropolitana, del Maule, de La Araucanía, de Los Ríos, de Los Lagos y de Aysén. Los peces fueron seleccionados al azar considerando peces superiores a 50 gramos. El número muestral fue de 14 individuos por centro de cultivo (336 peces en total), calculado según Thrusfield (2005), considerando una prevalencia de 1,5%, población infinita y con 95% de confianza.

Las muestras de reproductores de salmón del Atlántico (mantenidos en agua dulce) fueron extraídos de 14 centros ubicados en las regiones de La Araucanía, Los Lagos y Magallanes. La región de Aysén no presentó centros con reproductores. Los peces fueron seleccionados al azar considerando reproductores sin distinción de sexo. El número muestral corresponde a 38 individuos por cada centro de cultivo (266 peces en total), calculado según Thrusfield (2005).

Todos los peces fueron extraídos vivos desde las unidades de cultivo, luego sacrificados mediante sobredosis de anestesia. La extracción de los órganos se realizó posterior a la muerte en instalaciones adecuadas para evitar la contaminación. Las muestras de órganos que se colectaron y usaron en biología molecular corresponden a corazón y riñón de los peces, y fueron mantenidas en RNA-Later<sup>®</sup> hasta su análisis.

En breve, la extracción de material genético (corazón y riñón de los peces en RNA-Later®) se realizó por medio de EZNA® Total RNA KIT I. La detección con RT-qPCR PRV en Step One Real Time PCR System de Applied Biosystems. Para el caso de IPN y ASCV se realizó RT-PCR Sybr Green. Los partidores y la sonda usados son los siguientes:

- PRV (Piscine Orthoreovirus)
  - L1 Reverse (5-TGC TAA CAC TCC AGG AGT CAT TG-3)
  - L1 Forward (5-TGA ATC CGC TGC AGA TGA GAT-3)
  - L1 Sonda (5-FAM CGC CGG TAG CTC T-MGBNFQ-3)
  
- ASCV (Sybr Green) (Atlantic salmon Calicivirus)
  - Forward (5-GGT TGC CTA CTT TCC ACC AA-3)
  - Reverse (5-CGT TAG TTG GAT GCC ACA AG-3)
  
- IPNV VP2 (Sybr Green) (Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa)
  - Forward (5-CCG CAA CTT ACT TGA GAT CCA TTA TGC-3)
  - Reverse (5-CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG-3)

## Resultados

En las muestras analizadas de los ejemplares de salmón del Atlántico tanto de agua dulce como en los reproductores, se detectó la presencia del virus Piscine Reovirus (PRV), así como del Calicivirus del salmón del Atlántico (ASCV) y del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

Se demostró la coinfección de PRV con IPNV y ASCV, la cual se observó en 21 casos, siendo 6 casos en agua dulce y en 15 casos de reproductores. Este resultado complementa los datos de coinfecciones existentes en salmón Atlántico que se han reportado, ISAV / Togavirus (Kibenge et al 2000) e IPNV / SAV (Alphavirus del salmón) (Skotheim 2009). El estudio de Mikalsen et al (2014) describe el hallazgo de un nuevo virus ASCV (Calicivirus del salmón Atlántico), el cual se encuentra presente (diagnóstico mediante PCR) en los peces enfermos de HSMI y CMS (Síndrome Cardiomiopático) en Noruega.

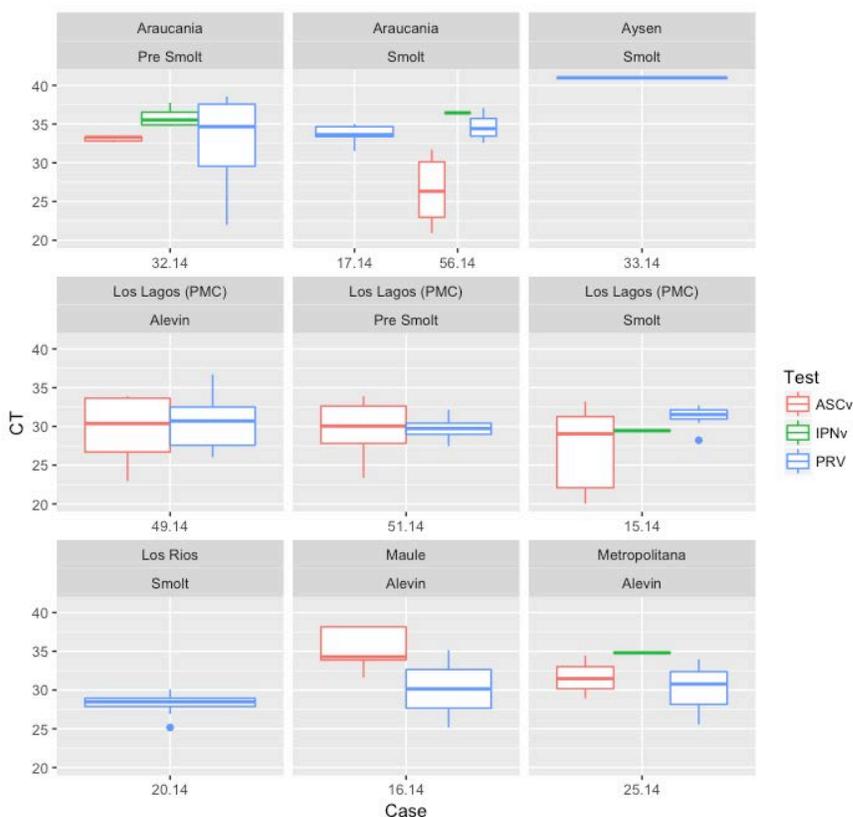
Los resultados describen la presencia de Piscine reovirus (PRV) mediante diagnóstico de biología molecular, en los peces en agua dulce en distintos estadios de crecimiento (Tabla 1). Además se detecta la presencia de un virus (ASCV) recientemente descrito en Noruega por Mikalsen et al (2014)

el calicivirus del salmón del Atlántico (Tabla 2.b.1).

**Tabla 2b.1. Resultados positivos de RT-qPCR Piscine Reovirus y Calicivirus del salmón del Atlántico para muestras de pisciculturas según fase de desarrollo.**

	PRV nº (Prevalencia %)	ASCV nº (Prevalencia %)	Total individuos
Alevin	30 (24 %)	6 (5 %)	126
Pre Smolt	61 (48 %)	22 (17 %)	126
Smolt	44 (52 %)	42 (50 %)	84
	135 (40 %)	70 (21 %)	336

Tanto PRV como ASCV se encuentran distribuidos a nivel nacional dentro de las pisciculturas, en los distintos estadios de salmónes del Atlántico. PRV puede presentarse como agente etiológico único en los peces, como ocurre en algunas pisciculturas de la Araucanía, Los Rios y de Aysén. También puede presentarse en co-infección con ASCV en pisciculturas en Maule y Los Lagos o en co-infección con ASCV e IPNV en La Araucanía, Los Lagos y Metropolitana (Figura 2b.1).

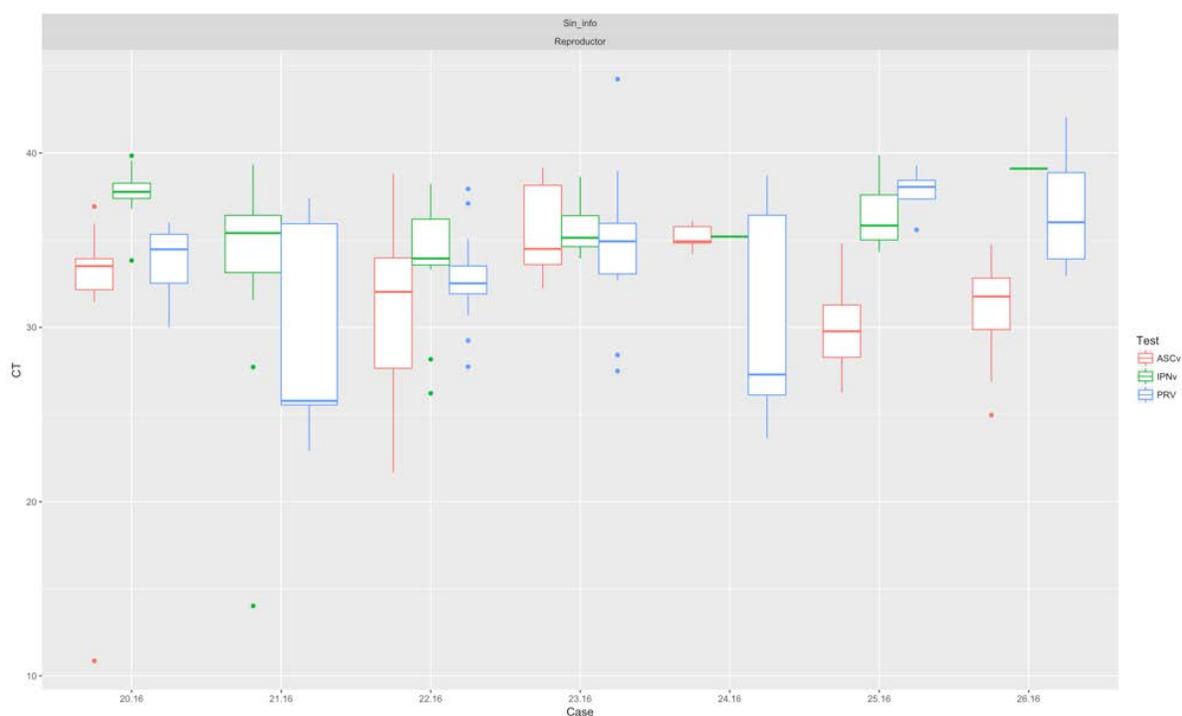


**Figura 2b.1. Resultados de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV según Región y estadio de salmón del Atlántico en fase de agua dulce.**

En los reproductores de salmón del Atlántico las prevalencias descritas de PRV y ASCV se resumen en la Tabla 2b.2. En los reproductores se observa que PRV y ASCV están presentes en la totalidad de las muestras analizadas (Figura 2b.2).

**Tabla 2b.2. Resultados positivos de RT-qPCR Piscine Reovirus y Calicivirus del salmón del Atlántico para muestras de reproductores**

	PRV nº (Prevalencia %)	ASCV nº (Prevalencia %)	Total individuos
Reproductores	95 (36 %)	6 (2 %)	266



**Figura 2b.2. Valores de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV en reproductores de salmón del Atlántico .**

Las coinfecciones descritas en estos resultados corresponden a 2 virus, siendo la principal coinfección de PRV y ASCV ya sea en salmones del Atlántico en fase de agua dulce y también en reproductores (Tabla 2b.3). La coinfección de 3 agentes virales (PRV-ASCV-IPNV) también se encuentra presente con mayor frecuencia en los peces de agua dulce que en reproductores (Tabla 2b.3).

**Tabla 2b.3. Resultados de Co-infecciones descritas en Agua dulce y reproductores**

	Prevalencia Agua Dulce (%)	Prevalencia Reproductores (%)
PRV-IPNV	6 (8 %)	30 (11 %)
ASCV-IPNV	7 (9 %)	26 (10 %)
PRV-ASCV	40 (50 %)	71 (27 %)
Coinfección (2 virus)	53 (66 %)	127 (48 %)
PRV-ASCV-IPNV	6 (8 %)	15 (6 %)
Coinfección Total	59 (74 %)	142 (53 %)

## Discusión

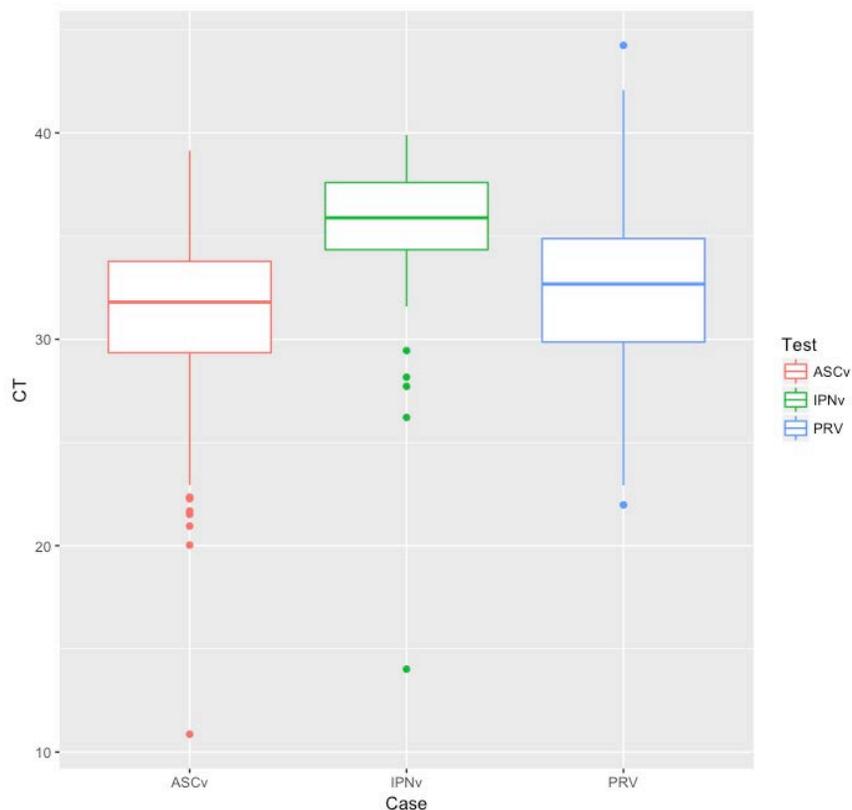
Establecer las distintas coinfecciones en los peces es importante, principalmente porque no sólo impiden la recuperación del hospedero, sino también crean confusión y retraso en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades (Eswarappa et al 2012). Las coinfecciones virales son un fenómeno común tanto en mamíferos como en peces (Rodriguez et al 2005, Tao et al 2007).

La prevalencia de PRV encontrada en los salmones del Atlántico de pisciculturas, ya sea alevines (24%), pre-smolt (48%) y smolts (52%), coincide con el estudio realizado en Noruega por Løvoll et al (2012), donde encontraron prevalencias de 36% en pre-smolts.

A diferencia de las altas prevalencias reportadas por Mikalsen et al (2014) en Noruega de 56% para ASCV en salmón del Atlántico en fase marina de cultivo. Nuestros resultados reportan prevalencias menores a estos valores en agua dulce. Interesante es que la prevalencia para ASCV aumenta a medida que los peces inician la smoltificación, lo cual puede ser producto de la inmunosupresión que se produce en esta etapa y podría ser consecuencia de una mayor replicación viral en esta fase.

Existen diferentes reportes de coinfecciones virales en salmón del Atlántico, entre estas se describe ISAV / Togavirus (Kibenge et al 2000) e IPNV / SAV (Alphavirus del salmón) (Skotheim 2009). Mikalsen et al (2014) describen la coinfección entre PRV y ASCV en salmón Atlántico en Noruega. Nuestros resultados evidencian la presencia no solo de la coinfección entre PRV - ASCV sino también entre PRV - IPNV y ASCV - IPNV. Además de la coinfección entre 3 agentes virales como son PRV-ASCV-IPNV. Esta triple coinfección está presente tanto en los peces en pisciculturas como en

reproductores. La figura 2b.3 muestra los valores de CT para los agentes virales PRV – ASCV – IPNV, analizados en el estudio.



**Figura 2b.3 Valores de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV en salmones del Atlántico en fase de agua dulce y reproductores (total de muestras).**

La figura 2b.4 muestra la distribución de los valores de CT en los casos de agua dulce como de reproductores. Se observa que a medida que aumentan los valores de CT de PRV, los valores de CT de ASCV disminuyen (Figura 2b.4(A)), esto corresponde a una correlación negativa ( $r=-0,12$ . Figura 5 recuadro inferior izquierdo), lo cual indicaría que la infección con un virus suprime la infección y/o replicación del otro virus (Wiik-Nielsen et al 2016). Para la coinfección PRV-IPNV (Figura 2b.4(B)) existe una correlación positiva (Figura 2b.5 recuadro inferior central), lo que explicaría un efecto sinérgico entre estos virus. Para el caso de la coinfección entre ASCV e IPNV no se observa una correlación clara (Figura 2b.5, recuadro central izquierdo).

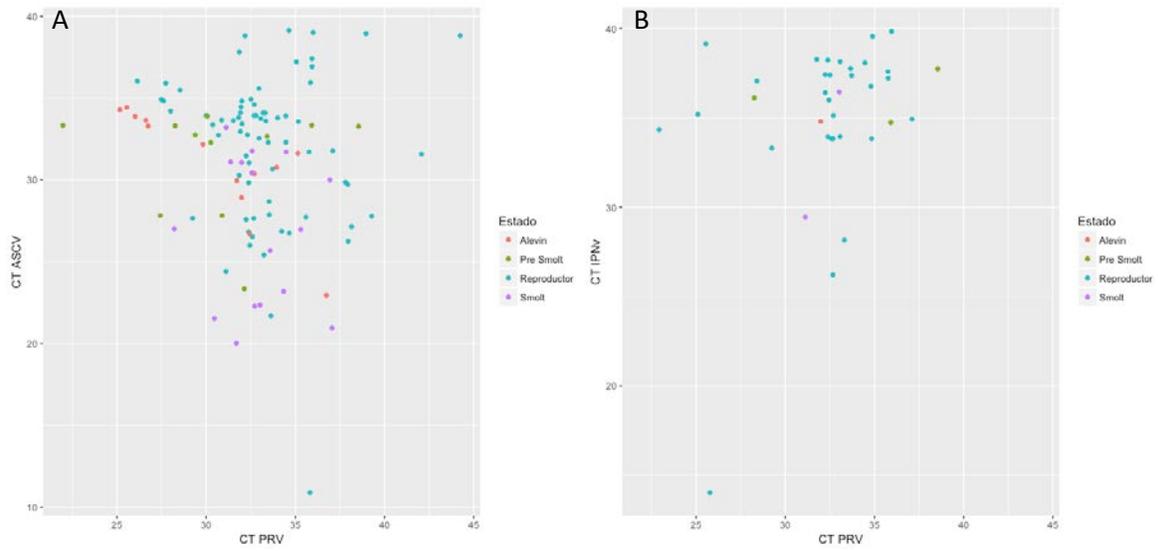


Figura 2b.4: Gráficos bivariados de CT para los agentes virales: (A) PRV-ASCV. (B) PRV-IPNV en salmones del Atlántico en fase de aguadulce y reproductores (total de muestras).

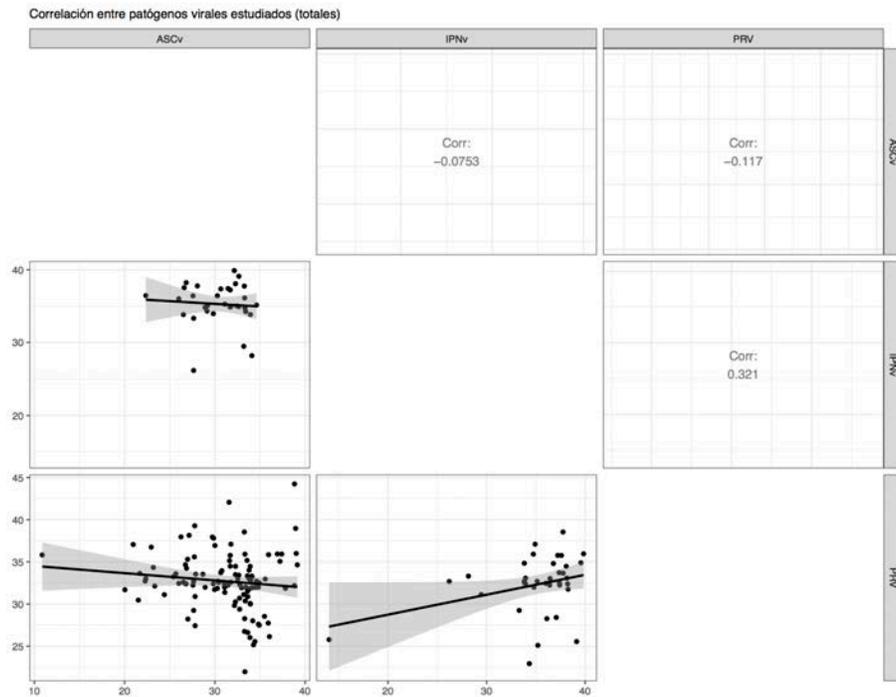


Figura 2b.5. Gráficos de correlación entre valores de CT para los agentes virales PRV, ASCV e IPNV en salmones del Atlántico en fase de agua dulce y reproductores (total de muestras).

## Conclusiones

- El estudio demuestra la presencia de calicivirus del salmón del Atlántico (CV) en salmones del Atlántico tanto de agua dulce como en reproductores clínicamente sanos.
- Se evidencia la coinfección entre dos agentes virales en las siguientes combinaciones PRV-ASCV, PRV-IPNV, ASCV-IPNV, siendo la primera (PRV-ASCV) la de mayor frecuencia tanto en agua dulce como en reproductores, ambos casos en salmón del Atlántico clínicamente sanos.
- Se detecta la coinfección triple entre PRV-ASCV-IPNV en los reproductores y en salmones del Atlántico en agua dulce clínicamente sanos.
- Los resultados de las correlaciones detectadas señalan un efecto potenciador (sinérgico) entre la coinfección PRV e IPNV, y un efecto supresor (antagónico) entre la coinfección ASCV y PRV.

## Referencias

- Eswarappa, S.M., Estrela, S., Brown, S.P., 2012. Within-Host Dynamics of Multi-Species Infections: Facilitation, Competition and Virulence. *PLoS ONE* 7, e38730.
- Kibenge, F.S.B., Whyte, S.K., Hammell, K.L., Rainnie, D., Kibenge, M.T., Martin, C.K., 2000. A dual infection of infectious salmon anaemia (ISA) virus and a togavirus-like virus in ISA of Atlantic salmon *Salmo salar* in New Brunswick, Canada. *Dis Aquat Org* 42, 11-15.
- Løvoll, M., Alarcon, M., Bang Jensen, B., Taksdal, T., Kristoffersen, A.B., Tengs, T., 2012. Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production. *Dis Aquat Org* 99, 7-U5.
- Mikalsen, A.B., Nilsen, P., Frøystad-Saugen, M., Lindmo, K., Eliassen, T.M., Rode, M., Evensen, Ø., 2014. Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Proposal for a New Genus of *Caliciviridae*. *PLoS ONE* 9, e107132.
- Rodriguez, S., Alonso, M., Perez-Prietol, S.I., 2005. Comparison of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Dis Aquat Org* 67, 183-190.
- Skotheim, S.A., 2009. Co-infection with Norwegian Salmonid Alphavirus (NSAV) and Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Chinook Salmon Embryo Cells (CHSE-214). The University of Bergen, Bergen, Norway.
- Tao, J.-J., Gui, J.-F., Zhang, Q.-Y., 2007. Isolation and characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish. *Aquaculture* 262, 1-9.

Thrusfield, M., 2005. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.

Wiik-Nielsen, J., Alarcon, M., Jensen, B.B., Haugland, O., Mikalsen, A.B., 2016. Viral co-infections in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., displaying myocarditis. *J Fish Dis* 39, 1495-1507.

### **Objetivo específico 3: Implementar y validar la técnica de inmunohistoquímica para piscine reovirus prv/hsmi.**

De los casos de HSMI detectados en las investigaciones oficiales, se realizó una descripción histopatológica, que se considera en la definición de caso de PRV y caso de HSMI, y se utilizaron estas muestras para implementar la técnica IHQ-PRV.

#### **Antecedentes de la descripción histopatológica de HSMI**

Se analizaron secciones de corazón, músculo esquelético, riñón, bazo, branquias e hígado, en la mayoría de los peces con RT PCR-PRV positivos y signos clínicos de HSMI.

Los análisis de los órganos analizados resultaron en los siguientes hallazgos histológicos.

**3.1.1. Corazón:** Todas las muestras presentaron pericarditis mononuclear difusa, en grados leves (Figura 3.1A) a severo (Figura 3.1B). Además, se observó en el miocardio de la mayoría de las muestras, un infiltrado mononuclear difuso, que abarca desde la capa compacta hasta la capa esponjosa, en grados leve (Figura 3.1A) a severo (Figura 3.1B). En algunos casos se observaron también focos de fibras miocárdicas degeneradas en la capa esponjosa.

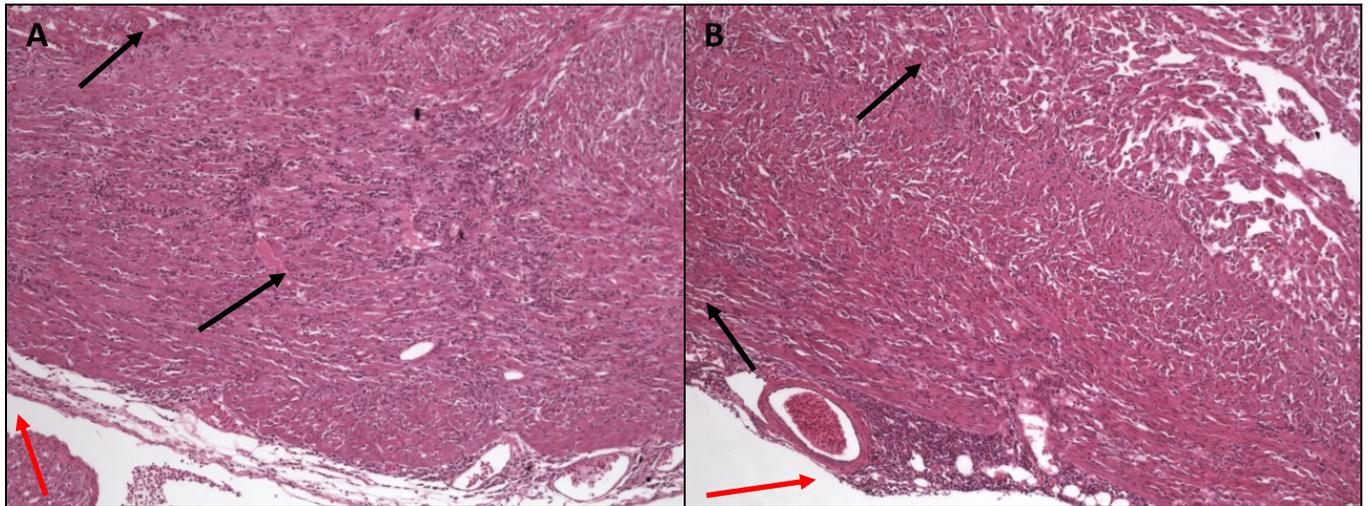
**3.1.2. Músculo esquelético:** En las muestras se presentó un infiltrado mononuclear leve a severo (Figuras 3.2A y 3.2B) en el músculo rojo. En las muestras fue posible observar además el reemplazo de las fibras musculares por fibroblastos (Figura 3.2B). No se observaron cambios en el músculo blanco.

**3.1.3. Hígado:** En 5 de 15 de las muestras analizadas se observaron zonas focales, periportales de degeneración y necrosis, con leve a moderada infiltración inflamatoria mononuclear.

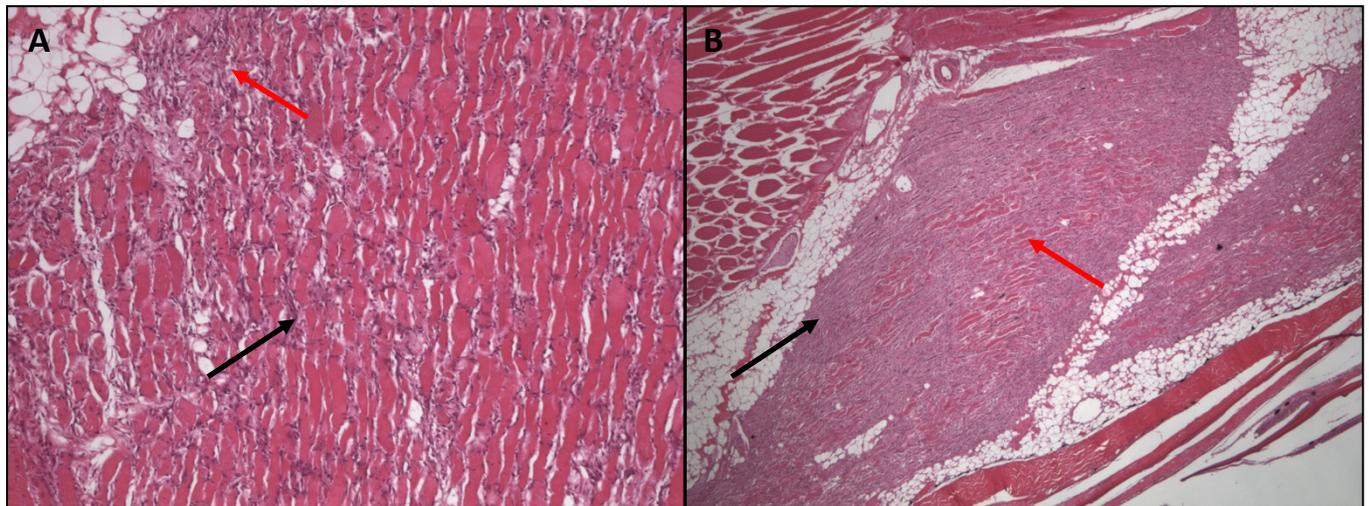
**3.1.4. Riñón:** La mayoría de las muestras presentan degeneración tubular en grado leve, acompañado de una leve infiltración mononuclear difusa en el intersticio.

**3.1.5. Bazo:** Todas las muestras presentaron depleción linfoide en grado leve a moderado.

**3.1.6. Branquias:** Todas las muestras presentaron hiperplasia epitelial en el ápex de las láminas primarias, con una leve fusión de laminillas secundarias.



**Figura 3.1. Corazón: (A) Caso 575-15-E. Epicarditis mononuclear difusa leve (flecha roja) y miocarditis difusa moderada, afectando tanto la capa compacta como la esponjosa (flechas negras). 10X, HE. (B) Caso 577-15-E. Epicarditis mononuclear difusa severa (flecha roja) y miocarditis difusa severa, afectando tanto la capa compacta como la esponjosa (flechas negras). 10X, HE.**



**Figura 3.2. Músculo esquelético rojo: (A) Caso 575-15-E. Miositis mononuclear difusa moderada (flecha negra), con moderada degeneración difusa de las fibras musculares (flecha roja). 40X, HE (B) Caso 577-15-E. Miositis mononuclear difusa severa (flecha negra), con severa degeneración difusa de las fibras musculares y reemplazo del tejido muscular por fibroblastos (flecha roja). 10X, HE.**

### **3.1.7. Diagnósticos histológicos morfológicos:**

- Miositis mononuclear difusa, moderada a marcada.
- Epicarditis mononuclear difusa, moderada a severa.
- Panmiocarditis mononuclear difusa, moderada a severa.
- Degeneración y necrosis hepática periportal, multifocal, leve a moderada.
- Degeneración tubular renal, multifocal, leve.
- Nefritis intersticial difusa, leve.
- Depleción linfocítica esplénica, difusa, leve.
- Hiperplasia epitelial branquial, focal en ápex, leve.

Los hallazgos observados tanto en corazón como en músculo esquelético rojo corresponden principalmente a cambios inflamatorios con infiltración mononuclear, acompañados de degeneración de las fibras musculares y/o miocárdicas. Los cambios relacionados al reemplazo de las fibras musculares del músculo rojo por fibroblastos sugieren que este proceso inflamatorio ya ha evolucionado a un proceso de reparación, siendo éste un signo de cronicidad.

El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución corresponden a los hallazgos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI).

### **3.2. Implementación de Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de PRV y diagnóstico de HSMI en órganos.**

Esta técnica fue aplicada para el diagnóstico directo del agente PRV en las lesiones observadas en los tejidos sospechosos y diagnosticadas previamente a través de histopatología. Se utilizaron dos protocolos, ambos usan métodos de detección con fosfatasa alcalina (Vectastain ABC-AP kit. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

#### **3.2.1. Protocolo – Anticuerpo Dr. Oystein Finstad:**

Se utilizó el anticuerpo *Anti-σ1*, obtenido a través de la cooperación con el Instituto Veterinario Noruego (NVI) con la Dra. Torunn Taksdal (NVI, Oslo, Noruega) y bajo las recomendaciones del investigador (Protocolo 1).

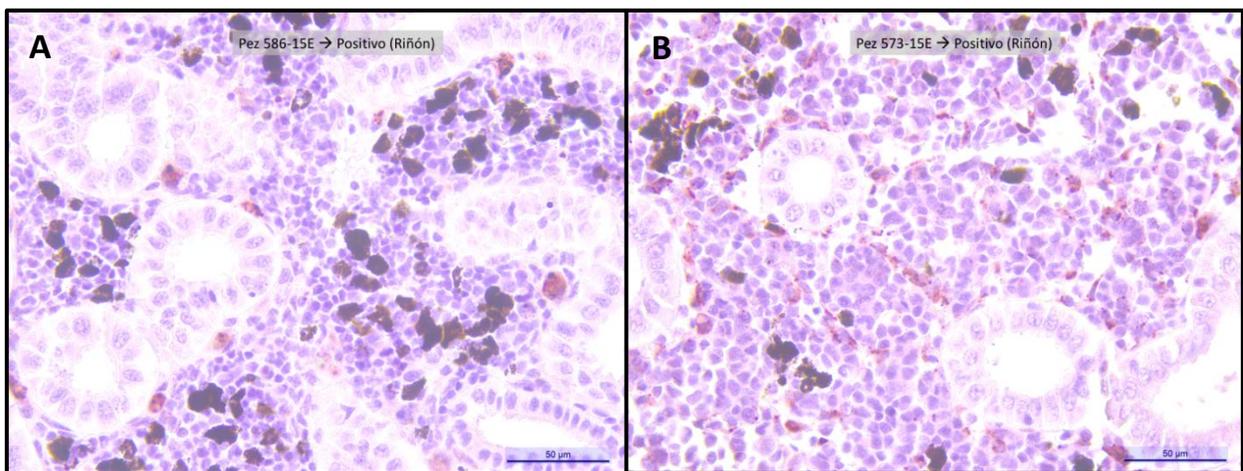
La aplicación de los anticuerpos y su dilución específica se determinó en base a ensayos concentración dependiente. Las recuperaciones antigénicas también se probaron en base a las recomendaciones para ese anticuerpo. El protocolo original fue sometido a modificaciones menores, ya que los resultados obtenidos fueron subóptimos, incluso en las muestras controles facilitadas también por el NVI (Oslo, Noruega).

A pesar de los cambios y adaptaciones, no se obtuvieron resultados positivos con este protocolo.

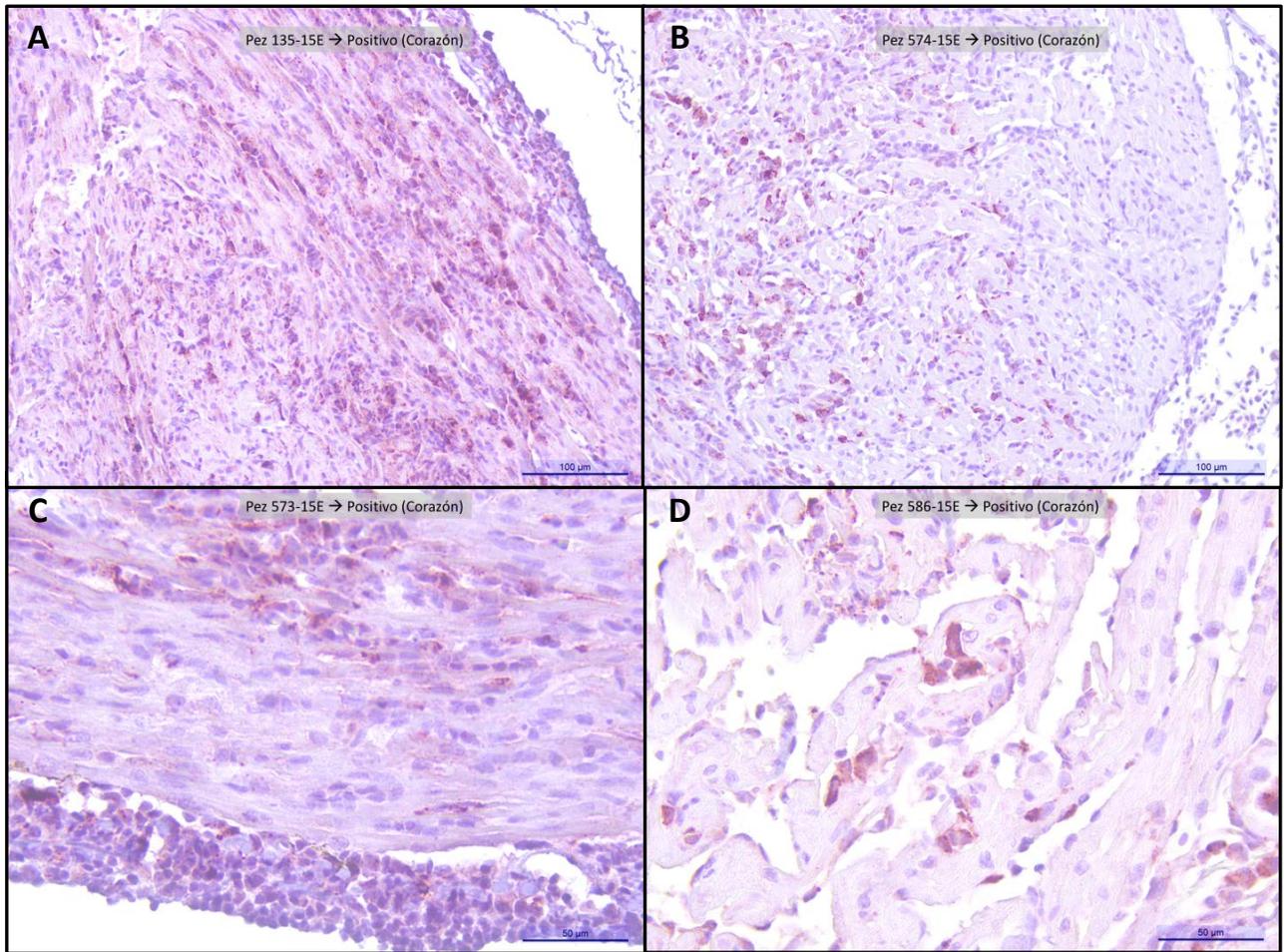
**3.2.2. Protocolo – Anticuerpo Dr. Marco Rozas:** Utilizando el anticuerpo obtenido a través de cooperación con el Laboratorio Pathovet (Dr. Marco Rozas, Puerto Montt, Chile) y bajo las recomendaciones del investigador se obtuvieron resultados positivos (Protocolo 2).

Las muestras analizadas fueron 8, incluyendo: riñón (Figura 3.3 A y B), corazón (Figura 3.4 A, B, C, D). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 135-15-E: positivo en corazón
- 586-15-E: positivo en corazón y riñón
- 573-15-E: positivo en corazón y riñón
- 574-15-E: positivo en corazón
- 588-593-594-590-15-E: negativos



**Figura 3.3. Riñón: Tinción positiva a IHQ para Piscine orthoreovirus, color café rojizo. (A) Caso 586-15-E. Tinción 40X, HE (B) Caso 577-15-E. 40X, HE.**



**Figura 3.4. Corazón: Tinción positiva a IHQ para Piscine orthoreovirus, color café rojizo. (A) Caso 586-15-E. Miocardio compacto. 10X, HE (B) Caso 574-15-E. Miocardio compacto. 10X, HE. (C) Caso 577-15-E. Epicardio y miocardio compacto. 40X, HE. (D) Caso 577-15-E. Miocardio esponjoso. 40X, HE.**

El protocolo 2 utilizado demostró que aquellos casos con CTs > 25,7 resultaron negativos a la IHQ-PRV, posiblemente porque la carga viral es baja y por lo tanto los antígenos fueron insuficientes para ser detectados por el anticuerpo y la técnica de IHQ (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1. Resultado de inmunohistoquímica para Piscine orthoreovirus en muestras de corazón y riñón de Salmo salar (n=8) según nivel de CT.**

Nro. Caso Figura 0-1	CT (valor PCR)		Resultado IHQ
135-15-E	< 25	24,4	(+) Corazón
586-15-E		24,8	(+) Corazón y riñón
573-15-E	25-30	25,1	(+) Corazón y riñón
574-15-E		25,7	(+) Corazón
588-15-E		28,9	(-)
593-15-E	>30	30,5	(-)
594-15-E		31,8	(-)
590-15-E		31,9	(-)

### 3.3. Conclusión

Los resultados de la técnica IHQ-PRV implementada indican que esta técnica es de utilidad para investigación de HSMI, pero no se recomienda su uso en el diagnóstico de rutina, por los resultados obtenidos de su sensibilidad. Solo es positiva solo si los valores de Ct de PRV en las muestras de órganos (corazón y músculo esquelético) son menores a 25,7.

### **PROTOCOLO 1 IHQ-PRV (Dr. Oystein Finstad)**

- **Tratamiento con microondas.**

Dejar 6 min en buffer citrato 0.1M pH6.0. Enfriar por 5 min en agua destilada

Dejar 6 min en buffer citrato 0.1M pH6.0. Enfriar por 15 min en PBS.

- **Bloqueo.**

Bloquear con suero de cabra 1:50 en 5% 20 min. de leche descremada - TRIS durante

- **Anticuerpo primario.**

Anti toda la noche a 4°C. sigma PRV 1:2500 diluido en leche descremada - TRIS. Dejar incubando

- **Anticuerpo secundario.**

Incubar durante 60 min.

Anticuerpo: anti-conejo biotinilado (Vectastain) 1: 200, diluido en TRIS - BSA 2.5%.

Lavar 3 veces - Incubar por 2 min en TRIS y luego pasar por TRIS - tween 0.1%

- **Complejo ABC/AP (Vectastain)**

Reactivo A y min antes de la incubación). Incubar 45 min. Lavar 3 veces B diluidos 1:100 en TRIS.

(Preparar 15 - 30 por 2 min en TRIS y luego pasar por TRIS - tween 0.1%

- **Sustrato**

Fast Red TR, 20 minutos

### **PROTOCOLO 2 IHQ-PRV (Dr. Marco Rozas-PATHOVET)**

- **Tratamiento con microondas.**

\*La recuperación antigénica en buffer citrato debe ser de 12 minutos:

1° programar microondas máxima potencia con 6 minutos. Rellenar recipiente con PBS.

2° programar microondas máxima potencia con 6 minutos más, retirar cuidadosamente y dejar enfriar o, alternativamente, utilizar agua destilada para enfriar paulatinamente los preparados.

Este proceso puede tomar 30 minutos. Una vez frío, realizar 2 lavados con PBS.

- **Bloqueo de peroxidasa**

Peróxido de hidrógeno 3% por 10 minutos

1 lavado de agua por 3 minutos

1 lavado PBS por 3 minutos

\*Bloqueo de antígeno

Suero de cabra 1:50 en 5% leche descremada e incubar 20 min. Una vez finalizada la incubación se deja estilar.

- **Anticuerpo primario.**

Anticuerpo: 1:500 / 1:1000 diluir con leche al 1% o con PBS 10x o con algún diluyente de anticuerpos universal. Esto se debe incubar toda la noche a 4°C. Hacer 2 lavados con PBS cada uno de 3 minutos

- **Anticuerpo secundario.**

Incubar por 30 minutos y hacer 2 lavados con PBS cada uno de 3 minutos.

- **Revelado**

Utilizar Novared y cortar reacción con agua destilada una vez los preparados se vuelvan de color rojo en 2 minutos. Si no sucede, dejar por más tiempo, pero no pasar de 5 minutos. Observar al microscopio si hay reacción.

- **Contraste**

10 segundos en hematoxilina de Harris. Lavar agua corriente por 3 minutos. Lavar agua destilada por 3 minutos.

1 Alcohol 70% 1minuto

2 Alcohol 95% 2 minutos

3 Alcohol 100% 3 minuto

4 Xilol por 3 minutos

5 Montar con sellante en base de xilol

PD: El tiempo de lavado puede ser opcional de 2 a 3 minutos, pero siempre más de uno. Ocupar cámaras húmedas tapadas en cada paso.

### **Referencias**

Finstad et al (2012). Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincides with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Vet Res.* 43:27.

## **Objetivo específico 4: Estandarización y validación del método de diagnóstico para el patógeno *Renibacterium salmoninarum***

### **4.1. Metodología**

#### **4.1.1. Amplificación por PCR gen 16S rRNA de *R. salmoninarum***

A partir de DNA genómico purificado de colonias de cultivo puro de *R. salmoninarum*, se amplificó el gen ribosomal 16S Eubacteriano utilizando los partidores universales UN y EB (Barry et al 1990). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con los siguientes componentes: Green Buffer PCR (Promega) 5X, 5 µl; MgCl<sub>2</sub> (Promega) 25 mM, 3 µl; dNTPs 10 mM c/u, 1 µl; partidor EB 25 µM, 1 µl; partidor UN 25 µM, 1 µl; GoTaq polimerasa (Promega) 5U/µl, 0,2 µl; templado de ADN diluido 1:50, 2 µl; agua grado PCR 11,8 µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial a 95°C por 3 min.; luego 35 ciclos de denaturación a 95°C por 1 min., apareamiento a 45°C por 1 min. y extensión a 72°C por 1 min.; y extensión final a 72°C por 5 min.

#### **4.1.2. Secuenciación del gen 16S rRNA de *R. salmoninarum***

Los productos de PCR del gen 16S rRNA de *R. salmoninarum*, se resolvieron y visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con Gel red, en Buffer TAE1X. Posteriormente, se realizó la extracción desde el gel de los productos de PCR utilizando el kit “Gel Extraction” (Omega BIO-TEK) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los productos de PCR fueron eluidos en agua libre de nucleasas y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen, Korea.

#### **4.1.3. Análisis filogenético**

Las secuencias obtenidas en el estudio fueron alineadas utilizando el programa ClustalW, junto a secuencias de la base de datos de GeneBank. Una correspondiente a *R. salmoninarum* previamente descrita por investigadores chilenos del INTA, y dos secuencias extra - como grupo externo - de *P. salmonis* y *B. subtilis*. El análisis filogenético de las secuencias se realizó utilizando el programa MEGA 7 (Kumar et al 2016). De entre las opciones disponibles se utilizó el método de Neighbor-joining, donde generando valor de bootstrap (replicados) de 1000 “árboles” se llegó a un árbol de consenso definitivo (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Datos generales de las cepas de *Renibacterium salmoninarum* incorporadas en el estudio de filogenia

Especie de bacteria	N° cepa	Hospedero	origen	Órgano
<i>R. salmoninarum</i>	02/15 CL	S. coho (agua dulce)	Chile	Músculo
<i>R. salmoninarum</i>	8/98 CL	S. Atlántico	Chile	Riñón
<i>R. salmoninarum</i>	s/i	s/i	Chile	s/i
<i>R. salmoninarum</i>	INTA10 CL	S. Atlántico	Chile	s/i
<i>R. salmoninarum</i>	ATCC 33739	s/i	s/i	s/i
<i>R. salmoninarum</i>	111 SCO	s/i	Escocia	Riñón
<i>R. salmoninarum</i>	9202 SCO	s/i	Escocia	Riñón
<i>B. subtilis</i>	CS2	s/i	s/i	Suelo
<i>P. salmonis</i>	EM90	S. Atlántico	Chile	s/i

s/i: sin información disponible

#### 4.1.4. Determinación de unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL)

Para comparar la capacidad de detección de las técnicas de Inmunofluorescencia, PCR anidado y PCR en tiempo real se trabajó con cultivos puros de *R. salmoninarum*, que fueron cuantificados a través de la determinación de unidades formadoras de colonias por mL de suspensión bacteriana (UFC/mL).

Diluciones en base 10 desde  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  de una suspensión inicial de *R. salmoninarum* fueron sembradas en duplicado en placas de medio sólido KDM<sub>2</sub> e incubadas a 15°C. Se realizaron observaciones diarias de las placas hasta observar crecimiento bacteriano de colonias aisladas para proceder con el recuento. Al cabo de 22 días de incubación, en la última dilución preparada ( $10^{-5}$ ) se presentaron colonias aisladas y se realizó la cuantificación. Ésta correspondió a  $2,65 \times 10^7$  UFC/mL. A partir de esta cuantificación se pudo determinar el límite de detección de las diferentes pruebas en términos de unidades equivalentes de UFC/mL.

#### 4.1.5. Inmunofluorescencia Indirecta (IFAT) para BKD

Para la estandarización de esta técnica se utilizó el kit comercial BKD-Fluorotest Indirecto (Anko Diagnostics). Éste es el único producto disponible en Chile para la detección de *R. salmoninarum* que utiliza anticuerpos marcados con un fluoróforo (FITC).

Este kit utiliza una solución de anticuerpos monoclonales primarios dirigidos contra antígenos de *R*

*salmoninarum*. Los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con FITC y reconocen IgG murinas.

Además de las soluciones de anticuerpos, el kit incluye reactivos para la dilución de los anticuerpos y solución de lavado para las diferentes etapas luego de los procesos de incubación. Siguiendo las indicaciones del fabricante se procedió de la siguiente forma:

- Muestras de riñón de salmónes del Atlántico (50mg) inoculadas con 100 µL de diluciones seriadas de cultivos puros de *R salmoninarum* (en base 10 y en base 2) fueron maceradas en un tubo de polipropileno de 1,5 mL. Adicionalmente, también fueron maceradas muestras sospechosas de presentar infección con *R salmoninarum*.
- El macerado de riñón fue luego extendido en portaobjetos utilizando tórculas de algodón.
- Las muestras fueron secadas al aire y luego fueron fijadas en Alcohol Metílico frío (-20°C) por 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS y secadas a temperatura ambiente.
- Junto con las muestras inoculadas y las muestras sospechosas se incluyeron controles positivos, correspondientes a extendidos de tejido renal previamente diagnosticados como positivos a *R salmoninarum* almacenados a -20°C en el laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Controles negativos correspondientes a muestras de tejido renal de *Salmo salar* no inoculadas también fueron incluidos en el ensayo.
- Sobre cada extendido de muestra se agregaron 100 µL de la solución de anticuerpos primarios previamente diluida 1:100 en la solución de dilución incluida en el kit.
- Los portaobjetos fueron incubados en cámara húmeda y oscuridad por 30 minutos y luego lavados dos veces con solución de PBS pH 7,2 por 5 minutos.
- Luego de los lavados, 100 µL de la solución de anticuerpos secundarios fueron agregados a las muestras y nuevamente se incubó en cámara húmeda y oscuridad por 30 minutos y se realizaron dos lavados de 5 minutos con solución PBS pH 7,2.
- Finalmente se utilizó un medio de montaje acuoso para preservar la fluorescencia y las muestras fueron cubiertas con cubreobjetos.
- Las lecturas fueron realizadas con el objetivo 1000x e inmersión en un microscopio de epifluorescencia marca OPTIKA modelo B-500TiFL usándose el filtro para excitación de 450-500 nm.

#### 4.1.6. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR)

Tanto diluciones de cultivos puros de *R salmoninarum* como muestras de tejido renal inoculadas con estas diluciones, fueron sometidas a extracción del ADN total utilizando E.Z.N.A.® Tissue DNA kit (Omega Biotek) siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de este proceso, se obtuvieron eluidos de 100 µL de ADN total que fue utilizado como templado para la reacción de nPCR.

Para la estandarización de esta técnica se utilizaron dos pares de partidores descritos por Pascho y col (1998) y recomendados por la OIE hasta 2003 (cuando la infección dejó de ser de notificación obligatoria).

El primer par de partidores (Forward: P3. Reverse: M21) amplifican un segmento de 383 pb dentro de la región 5' del gen *msa1* que codifica para la proteína p57, el principal antígeno de *R salmoninarum*. El segundo par de partidores (Forward: P4. Reverse: M38) amplifican un segmento interior dentro de la zona blanco cuya extensión es de 320 pb.

Detalles de la reacción primera ronda de amplificación:

Reactivos	Volumen por reacción	Concentración por reacción
Agua DEPC	11,3 µL	-
GoTaq® Green Buffer 5x	5 µL	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µL	3 mM
Mix nucleótidos (1 mM)	2 µL	1 mM
Forward primer P3 (10µM)	0,5 µL	0,5 µM
Reverse primer M21 (10µM)	0,5 µL	0,5 µM
G2 GoTaq® Hot start Polymerase 5U/ µL	0,2 µL	1,25 U
Templado de AND	2,5 µL	10-100 ng
Volumen Total	25 µL	

El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente:

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	95°C	3 minutos	1
Denaturación	95°C	1 minuto	30
Annealing	65°C	1 minuto	30

Extensión	72°C	1 minuto	30
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Para la segunda ronda de amplificación, se utilizó una nueva mezcla para PCR con las mismas concentraciones y los reactivos a excepción de los partidores que fueron reemplazados por los partidores P4 y M38 en las mismas concentraciones. De la reacción anterior se utilizó 1 µL como templado para esta segunda ronda y se ajustó el volumen final a 25 µL con agua grado biología molecular libre de DNasas y RNasas.

Las condiciones de amplificación fueron las mismas, pero el número de ciclos se rebajó de 30 a 10. Al finalizar la segunda ronda de amplificación 5 µL del producto amplificado fueron cargados en un gel de agarosa al 2% teñido con el reactivo GelRed® (Biotium) y sometidos a electroforesis a 100 Volts durante 45 minutos. Los geles fueron visualizados con un transiluminador U.V. y las imágenes fueron registradas digitalmente.

#### **4.1.7. Real time PCR (qPCR)**

Luego de una búsqueda bibliográfica, se eligió un protocolo de amplificación que utiliza partidores específicos para un segmento de 69 pb dentro del gen *msa* que codifica para la proteína p57, usando el sistema de sondas de hidrólisis TaqMan® (Life Technologies). Esta técnica y protocolo fueron descritos en una primera instancia por Chase y col (2006), la que fue modificada por Elliot y col (2013), realizando una modificación menor, que consistió en el cambio del fluoróforo *quencher* del extremo 3' de la sonda (TAMRA) por un *quencher* no fluorescente (NFQ MGB). Las secuencias de los partidores y de la sonda se encuentran fuera de la zona blanco que se usa para la reacción PCR anidado con el fin de evitar contaminación con amplicones de ésta última reacción. Cabe mencionar que los autores de la publicación mencionada pertenecen al laboratorio de referencia OIE para *R salmoninarum*.

El proceso de extracción del material genético se llevó a cabo de la misma forma que para la PCR anidada con E.Z.N.A.® Tissue DNA kit (Omega Biotek). La reacción y el análisis de PCR en tiempo real fueron llevados a cabo en un equipo StepOne (Thermofisher).

Los detalles de las mezclas de reacción fueron las siguientes:

Reactivos	Volumen por reacción	Concentración por reacción
Agua DEPC	2 µL	-
TaqMan® Universal Master Mix II	10 µL	1x
Forward primer RS 1238F (10µM)	1 µL	500 nM
Reverse primer RS 1307R (10µM)	1 µL	500 nM
TaqMan® probe RS 1262 NFQ (2.5 µM)	1 µL	125 nM
Templado de AND	5 µL	10-100 ng
Volumen Total	20 µL	

El detalle del protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente:

Ciclos	Condiciones
1	50°C por 2 min
1	95°C por 10 min
40	95°C por 15 seg
	60°C por 1 min

Para la estandarización de la técnica de qPCR, se construyeron curvas estándar a partir de diluciones seriadas de cultivos puros de *R salmoninarum* que fueron sometidas a extracción de ADN y luego a PCR en tiempo real en triplicado.

Una vez generada la curva estándar para la técnica se pudo establecer una correspondencia entre los valores de Ct (Threshold Cycle: Ciclo de Umbral) obtenidos para las diferentes diluciones de bacterias extraídas y la cantidad de UFC/mL obtenidas para la suspensión inicial de cultivo puro de *R salmoninarum*. Esto utilizando la ecuación de la recta obtenida a partir del análisis. De esta forma se pudo proponer un límite de detección de esta técnica de PCR en tiempo real de 26,5 UFC/mL.

La ecuación para nuestra técnica de laboratorio fue la siguiente:

Concentración bacteriana (equivalentes UFC/mL)

La evaluación de muestras desconocidas fue realizada en duplicado. Una muestra fue considerada como positiva cuando ambos duplicados mostraban valores Ct, que correspondió al límite menor de detección ( $\geq 26,5$  UFC de *R salmoninarum* por reacción), y una muestra fue considerada como negativa si ambos duplicados no entregaban valores de Ct. Las muestras que entregaron valores de Ct mayores de 37, deberían ser consideradas como sospechosas, debido a que esta cantidad de bacterias podría estar relacionada con contaminación de ADN dentro del laboratorio, o una muy baja carga bacteriana en la muestra extraída.

#### **4.2. Resultado de las encuestas aplicadas a los Laboratorios de la Red de SERNAPESCA**

Del resultado de las encuestas aplicadas a los Laboratorios de la Red de SERNAPESCA, se destaca que todos utilizan técnicas basadas en biología molecular, fundamentalmente PCR tiempo real, y secundariamente IFAT en el *screening* de los reproductores para BKD. En los peces en producción, también se emplea principalmente PCR tiempo real, e IFAT, además, cultivo en agar y antibiograma, en el diagnóstico de BKD de rutina (Ver en anexo las encuestas).

#### **4.3. Resultado de la búsqueda de proveedores de Kit Diagnósticos detección**

##### ***Renibacterium salmoninarum* por inmunofluorescencia**

- **Proveedor: Europharma**

Solicitamos una cotización de antisuero anti-*Renibacterium salmoninarum* el día 16.12.15 y nos respondieron el mismo día que ya no trabajan con ese producto.

- **Provedor: Centrovvet representa en Chile al Laboratorio AquaticDiagnostics Ltd.**

Hemos intentado obtener una cotización de antisuero para *Renibacterium salmoninarum* producto elaborado por AquaticDiagnostics Ltd., sin éxito.

Se envía un mail el 16.12.15 solicitando la cotización de antisuero para *Renibacterium salmoninarum*. Como no había respuesta nos comunicamos vía telefónica el día 06.01.16 y solicitamos que nos respondieran vía mail, nos informaron que habían enviado una cotización con fecha 17.12.15 y aún no tenían respuesta de la empresa proveedora Escocesa. 20.01.16: Enviamos un mail para solicitar información y nos respondieron que aún no tienen respuesta de la empresa.

- **Proveedor: Grupo Bios**

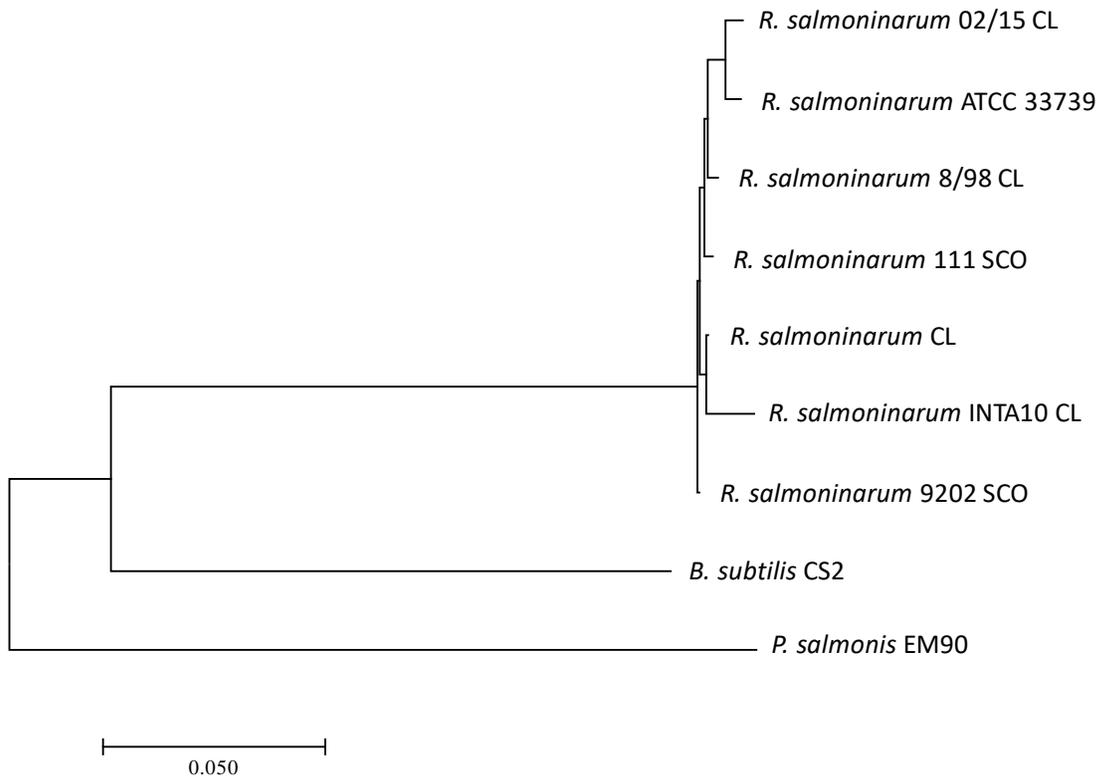
Se envía un mail el 16.12.15 solicitando la cotización de antisuero para *Renibacterium salmoninarum*. Responden que ya no lo distribuyen y que la línea de productos fue adquirida por la empresa ANGO SCIENCE SPA.

- **Proveedor: ANGO SCIENCE SPA, esta empresa adquirió esta línea de productos del Grupo Bios**

Se envía un mail solicitando cotización de antisuero para *Renibacterium salmoninarum* el día 07.01.16. Se recibe cotización del producto BKD–FluoroTest Indirecto: Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta para *Renibacterium salmoninarum*. **El producto fue adquirido con fecha 21.01.16.**

#### **4.4. Resultado del análisis filogenético de cepas de *Renibacterium salmoninarum***

Del análisis filogenético realizado, se destaca que las cepas chilenas analizadas en este estudio, se encuentran ubicadas en un clado bien definido y filogenéticamente estrecho, que agrupa a todas las secuencias obtenidas en el mismo grupo de *R. salmoninarum* (Figura 4.1). Estos resultados sugieren, que no existiría una gran variación a nivel del gen 16S entre los aislados de ésta bacteria. Es importante señalar que estas bacterias fueron positivas a la detección por PCR utilizando partidores descritos en el manual de la OIE y se están evaluando otros partidores para realizar estudios comparativos de la sensibilidad y especificidad de la reacción de PCR.



**Figura 4.1. Análisis filogenético:** La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining. La figura muestra el árbol de consenso y la suma de la longitud total de las ramas es de 0,048044916. El árbol está dibujado a escala en las mismas unidades utilizadas para calcular las distancias evolutivas. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Máxima probabilidad. El análisis involucró 9 secuencias de nucleótidos donde *B. subtilis* cepa CS2 y *P. salmonis* cepa EM90 fueron usadas como grupo externo. Todas las posiciones que contenían gaps o datos perdidos, fueron eliminadas. Hubo un total de 946 posiciones en el set de datos final.

Los resultados de filogenética de *R. salmoninarum* sugieren, que no existiría una gran variación a nivel del gen 16S entre los aislados de ésta bacteria, pudiendo asumir que la aplicación de técnicas de detección por biología molecular (PCR) serían de gran especificidad. Lo anterior, permite sugerir que existiría una baja probabilidad de falsos positivos en las muestras tomadas desde aislados presentes en Chile al aplicar la reacción de PCR. Es importante señalar que estas bacterias fueron positivas a la detección por PCR utilizando partidores descritos en el Manual de la OIE.

#### 4.5. Resultados de IFAT-BKD

Con excepción de las muestras sin diluir, ninguno los experimentos realizados en tejido renal inoculado con diluciones en base 10 de cultivos puros de *R salmoninarum* produjo reacción de fluorescencia con el kit evaluado. Sin embargo, al realizar diluciones en base 2 hubo inmunoreacción en las muestras sin diluir hasta la dilución 1:8. Es importante mencionar que esta técnica exige un alto grado de entrenamiento para visualizar correctamente a las formas bacterianas. La capacidad de detección de IFAT es mucho menor a la de las técnicas moleculares evaluadas en este proyecto. Un cuadro comparativo de la capacidad de detección es presentado posteriormente. A continuación, se muestra una fotografía obtenida desde el microscopio de fluorescencia con una mezcla de 50 mg de tejido renal con la suspensión bacteriana sin diluir (Figura 4.2).



Figura 4.2. Microfotografía de frotis renal sin dilución de *R salmoninarum*. Se observan algunas bacterias con fluorescencia específica.

#### 4.6. Resultados de PCR anidado para BKD (nPCR-BKD)

En general la técnica de PCR anidado fue capaz de detectar cantidades de bacterias hasta la dilución  $10^{-6}$  de la dilución original a partir de cultivos puros, lo que correspondería aproximadamente a 26,5 UFC/mL. Al agregar tejido renal (50mg) la capacidad de detección disminuye a la dilución  $10^{-5}$ .

Es importante destacar que los tiempos de reacción sobrepasan las 3 horas y esta técnica es susceptible de contaminación dentro del laboratorio, puesto que se debe hacer apertura de tubos luego de la primera ronda de amplificación, aumentando la probabilidad de contaminación con amplicones cuando se cargan los tubos para la segunda ronda. Es fundamental por lo tanto contar con adecuados controles negativos sin templado, que permitan monitorear la adecuada carga de las muestras en los tubos de reacción.

#### **4.7. Resultados de PCR tiempo real para BKD (qPCR-BKD)**

En general, la técnica de qPCR se comporta de forma similar en cuanto a resultados a lo que se obtuvo para PCR anidado. Con qPCR se pudieron detectar cantidades de bacterias hasta la dilución  $10^{-6}$  de la dilución original a partir de cultivos puros (26,5 UFC/mL aproximadamente). Disminuyendo la capacidad de detección a la dilución  $10^{-5}$  cuando se agregan 50mg de tejido renal.

A diferencia de lo que ocurre con el PCR anidado convencional, con la técnica qPCR disminuyen los tiempos de reacción y se reducen riesgos de contaminación asociados a la apertura de tubos entre la primera y segunda ronda de amplificación. Sin embargo, el sistema sigue siendo susceptible a la contaminación cruzada de las muestras, por lo que resulta fundamental también la incorporación de controles negativos sin templado y poner especial cuidado cuando se cargan las muestras en las placas para evitar este fenómeno.

#### **4.8. Comparación de resultados IFAT-BKD, nPCR-BKD y qPCR-BKD**

Además de diluciones de cultivos puros de *R salmoninarum*, fueron evaluadas muestras de tejido renal (50mg) inoculadas con diluciones de cultivos puros y muestras de riñón de animales infectados en forma experimental.

Tanto la técnica de PCR anidado como la de PCR en tiempo real fueron capaces de detectar el gen *msa* desde tejido renal inoculado hasta dilución  $10^{-5}$  de la suspensión inicial y tejido renal de individuos intraperitonealmente inoculados con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC a partir del día 3 post-inoculación (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2. Comparación de la sensibilidad de IFAT, nPCR y qPCR para la detección de *R salmoninarum* según concentración bacteriana y su dilución.**

Concentración Bacteriana (UFC/mL)	Dilución de trabajo	Interpretación Resultado IFAT	Interpretación Resultado PCR anidado	Valor Ct medio	Interpretación Resultado qPCR
26,5	$1 \times 10^{-6}$	-	+	36.241	+
$2,6 \times 10^2$	$1 \times 10^{-5}$	-	+	33.561	+
$2,6 \times 10^3$	$1 \times 10^{-4}$	-	+	30.273	+
$2,5 \times 10^4$	$1 \times 10^{-3}$	-	+	26.76	+
$2,5 \times 10^5$	$1 \times 10^{-2}$	-	+	23.37	+
$2,5 \times 10^6$	$1 \times 10^{-1}$	-	+	19.44	+
$2,5 \times 10^7$	$1 \times 10^1$	+	+	16.89	+

#### **4.9. Conclusión**

De la tabla 4.2 se puede concluir, que la detección de *R salmoninarum* con las técnicas disponibles en el país hasta el momento es mucho más sensible a través de la aplicación de métodos moleculares, como el nPCR anidado o real-time qPCR. La técnica IFAT es menos recomendable para estos fines por su baja sensibilidad.

Entre todas las técnicas evaluadas, dado los tiempos de reacción y procesamiento de muestras, resulta mucho más eficiente el uso de qPCR, teniendo en consideración la necesidad de establecer controles de los riesgos de contaminación cruzada intra-laboratorio que podrían ocurrir.

**Objetivo específico 5: Realizar un estudio epidemiológico que dé cuenta de la situación actual de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (*Renibacterium salmoninarum*) en el territorio nacional.**

### **5.1. Determinación de la prevalencia de BKD a nivel de centros productores de alevines - smolts y de reproductores**

Para la determinación de la prevalencia a nivel de centros se utilizó la base de datos de los centros productores de alevines, pre-smolts y smolts, utilizadas para el estudio de la prevalencia de PRV. Para determinar la prevalencia de BKD en reproductores se utilizó la información de los *screening* de los reproductores otorgada por SERNAPESCA, de los años 2016 (Tabla 5.1).

#### **5.1.1. Determinación de la prevalencia**

$$\text{Prevalencia de infección de centros BKD} = \frac{\text{Número de centros infectados}}{\text{Número total centros de muestreos}} \times 10^n$$

$$\text{Prevalencia de infección de reproductores BKD} = \frac{\text{Número de reproductores infectados}}{\text{Número total reproductores de muestreados}} \times 10^n$$

Para la determinación del intervalo de confianza de la prevalencia a nivel poblacional se utilizó la

$$\hat{p} \pm 1,96 \left( \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}} \right)$$

siguiente fórmula:

P=prevalencia de reproductores por BKD

Z=1,96 con 95% confianza para la distribución normal

n= tamaño de la muestra

## 5.2. Determinación de factores de riesgo y protectivos asociados a la infección por *Renibacterium salmoninarum* (BKD) en reproductores de salmón del Atlántico.

Se trabajó con la totalidad de la población de reproductores que le realizaron screening en la temporada 2016 (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Número de reproductores analizados por región en *screening* realizado en el año 2016.

	Reproductores
Regiones	total
Bío-Bío	13
Araucanía	23.125
Los Ríos	7.090
Los Lagos	42.449
Aysén	14.294
Magallanes	2.172
Total	89.143

Se realizó un análisis epidemiológico descriptivo analizando las variables relacionadas con el ejemplar, ambiente y tiempo, presentado a través de tablas de frecuencia.

## 5.3. Resultados de la prevalencia de BKD en reproductores

Durante el año 2016 se muestrearon un total de 89.143 reproductores de los cuales 9.508 fueron machos y 79.635 hembras. La prevalencia de infección por BKD fue de 1,41% (IC 1,40-1,411), al evaluar el nivel de infección por especie podemos observar en la tabla 5.2, que la prevalencia más alta la obtuvo salmón coho con un 2,63% seguida de s. Atlántico (1%) y la prevalencia menor la trucha arco Iris (0,1%).

**Tabla 5.2. Prevalencia de BKD en reproductores según especies, año 2016.**

Especie	Reproductores	
	BKD+ / total	Prevalencia %
S. coho	874 / 33.241	2,63
S. del Atlántico	360 / 35.898	1,00
Trucha arcoíris	20 / 20.004	0,10
Total	1.254 / 89.143	1,41

En cuanto al sexo de los reproductores se evaluaron 9.508 machos y 79.635 hembras, de estos ambos sexos presentaron una prevalencia de 1,4% de animales infectados (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3. Prevalencia de BKD en reproductores según sexo, año 2016.**

Sexo	Reproductores	
	BKD+ / total	Prevalencia %
Machos	134 / 9.508	1,41
Hembras	1.120 / 79.635	1,41
Total	1.254 / 89.143	1,41

En cuanto a la distribución geográfica (Tabla 5.4) se evaluaron reproductores provenientes desde las regiones del Bío-Bío hasta la Araucanía, siendo las regiones del extremo sur con prevalencias mayores de 2,84% y 2,07% para Aysén y Magallanes, respectivamente.

**Tabla 5.4. Prevalencia de BKD en reproductores según región, año 2016.**

Regiones	Reproductores	
	BKD+ / total	Prevalencia
Bío-Bío	0/13	0
Araucanía	171 / 23.125	0,74
Los Ríos	10 / 7.090	0,14
Los Lagos	622 / 42.449	1,47
Aysén	406 / 14.294	2,84
Magallanes	45 / 2.172	2,07
Total	1.254 / 89.143	1,41

#### **5.4. Resultados de prevalencia de BKD en centros de s. Atlántico en etapa de producción de alevines a smolts.**

Se evaluaron 50 centros ubicados entre la región del Bío-Bío hasta Magallanes, en donde el 10% presentaron especímenes infectados por *R. salmoninarum*, al analizar la positividad por categoría fueron los pre-smolts y smolts afectados con un 12,9 %, en cambio los centros con alevines y juveniles la prevalencia fue de un 5,3% (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5. Prevalencia de BKD en centros de s. Atlántico según etapa de producción**

Etapa	Centros	
	BKD+/total	Prevalencia %
Alevines-juveniles	1/19	5,3
Pre smolts-smolts	4/31	12,9
Total	5/50	10

En cuanto a la distribución espacial de los centros con diagnóstico de BKD (Tabla 5.6), solo 3 regiones presentaron centros con diagnóstico de BKD, estas fueron las regiones del Bío-Bío y Araucanía con 1 centro diagnosticado y la región de Los Lagos con 3 centros positivos.

**Tabla 5.6. Prevalencia de BKD en centros productores de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) según región.**

Regiones	Centros	
	BKD+/ total	Prevalencia %
Metropolitana	0/1	0,0
Maule	0/2	0,0
Bío-Bío	1 /2	50,0
Araucanía	1/16	6,3
Los Ríos	0/4	0,0
Los Lagos	3/23	13,0
Aysén	0/1	0,0
Magallanes	0/1	0,0
Total	5/50	10,0

## 5.5. Conclusiones

- La prevalencia de BKD en reproductores de un 1,41% se considera baja, con una distribución desde la Araucanía hasta Magallanes.
- La prevalencia fue más alta en reproductores de la especie salmón coho (2,63%), seguido de salmón Atlántico (1,0%) y la trucha arco iris, afecta por igual a machos y hembras.
- La prevalencia a nivel de centros de agua dulce fue de 10%, siendo detectada en centros de las regiones del Bío-Bío, La Araucanía y los Lagos. Sin embargo, es referencial por la influencia del porcentaje de prevalencia de la región Bío-Bío.
- Se determinó que la prevalencia se incrementa durante la fase de agua dulce en alevines de 5,3% y en smolts 12,9%, lo que indicaría una eficiente transmisión horizontal de *Renibacterium salmoninarum* en agua dulce.

## Objetivo específico 6: Ring Test en la detección de *Renibacterium salmoninarum* por los Laboratorios de Diagnóstico de la Red

El objetivo de esta prueba inter-laboratorios (Ring Test-BKD) fue evaluar el rendimiento de los laboratorios para diagnosticar muestras de ADN bacteriano de *R salmoninarum* a través de sus propias técnicas de PCR en tiempo real.

### 6.1. Laboratorios participantes

En total, trece laboratorios de diagnóstico participaron en la prueba y fueron nombrados desde A hasta N, correspondiendo éste último al Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática que realiza la técnica de PCR en tiempo real con química Taqman en un equipo StepOne de Applied Biosystems®, con el detalle informado en el objetivo específico 4.

### 6.2. Composición de las muestras

Se prepararon grupos de 7 muestras para ser distribuidas a cada laboratorio. Cada grupo consistió en 6 muestras positivas y una muestra negativa. Las muestras positivas correspondieron a ADN bacteriano extraído desde diferentes diluciones de cultivos puros de 3 cepas de campo de *R salmoninarum* aisladas en el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. La muestra negativa correspondió a ADN extraído desde cultivo puro de una cepa de *Arthrobacter sp*, una bacteria ambiental que sería el ancestro de *R salmoninarum* y que carece del gen *msa* (Tabla 6.1).

Se prepararon alícuotas de 100 µL de cada una de las diluciones de ADN bacteriano en tubos de polipropileno con agua libre de nucleasas. Los tubos fueron rotulados en código para asegurar la prueba en ciego y fueron enviados a temperatura ambiente a cada laboratorio.

Tabla 6.1. Resumen de las muestras enviadas

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Resultado esperado
M01	<i>R salmoninarum</i> Cepa 9-08 dilución 10 <sup>-4</sup>	Positivo
M02	<i>R salmoninarum</i> Cepa 9-08 dilución 10 <sup>-4,5</sup>	Positivo
M03	<i>R salmoninarum</i> Cepa 9-08 dilución 10 <sup>-5</sup>	Positivo
M04	<i>R salmoninarum</i> Cepa 9-08 dilución 10 <sup>-4</sup>	Positivo
M05	<i>Arthrobacter sp</i>	Negativo
M06	<i>R salmoninarum</i> Cepa 2-15 dilución 10 <sup>-4</sup>	Positivo
M07	<i>R salmoninarum</i> Cepa 1-16 dilución 10 <sup>-3</sup>	Positivo

Previo al envío de las muestras, se envió un instructivo indicando el uso de las muestras como templado directamente en las reacciones de PCR en tiempo real. Del mismo modo se envió una planilla Excel para ser llenada por cada laboratorio participante con los resultados de la prueba.

Una vez recibidas las muestras, los laboratorios informaron a SERNAPESCA la recepción de éstas y en aproximadamente dos días enviaron las planillas con los datos solicitados.

Las muestras positivas fueron informadas como valores de Ct utilizando valor de treshold de 0,1 y valor de Ct utilizando el valor de treshold de cada laboratorio. Adicionalmente, se solicitaron detalles de la técnica como el volumen de templado y el volumen de reacción utilizados, las marcas comerciales de los equipos utilizados y la química usada por cada laboratorio para realizar diagnóstico.

### 6.3. Resultados

En la tabla 6.2 se resume la información de la química, equipos usados y el gen evaluado por los Labs participantes en el Ring Test-BKD aplicado.

**Tabla 6.2. Resumen de la química y plataforma utilizada por los laboratorios participantes para la detección de *R salmoninarum*.**

Laboratorio	Química para detección	Plataforma de PCR tiempo real	Gen evaluado en el diagnóstico
A	Taqman, LifeTechnologies	StepOne plus, Applied Biosystems	<i>msa</i>
B	Roche LightCycler 480 II Master Probes	Roche LightCycler 480 II	<i>msa</i>
C	Roche LightCycler 480 II Master Probes	Roche LightCycler 480 II	<i>msa</i>
D	Takyon ROX Probe 2X MasterMix	Mx3000P, Stratagene	<i>msa</i>
E	Agpath-ID, IDT	Mx3000P, Stratagene	<i>msa</i>
F	Roche	Mx3000P, Stratagene	<i>msa</i>
G	Kapa Probe Fast Universal qPCR Kit	Mx3000P, Stratagene	<i>msa</i>
H	Express qPCR SuperMix, Invitrogen	StepOne plus, Applied Biosystems	16S

I	Brilliant III Ultra Fast qRTPCR, Agilent	Mx3000P, Stratagene	16S
J	Agilent	Mx3000P, Stratagene	<i>msa</i>
K	Roche LightCycler 480 II Master Probes	Roche LightCycler 480 II	<i>msa</i>
L	Takyon ROX Probe master mix, Eurogentec	Mx3000P, Stratagene	<i>msa</i>
M	Takyon ROX Probe master mix, Eurogentec	Mx3000P, Stratagene	<i>msa</i>
N	Taqman, LifeTechnologies	StepOne, Applied Biosystems	<i>msa</i>

Tabla 6.3. Valores de Ct utilizando un valor de treshold de 0.1, calculados de cada Laboratorio.

Muestra	Resultado esperado	Laboratorio													
		A	B	C	D	E	F	G	H*	I	J	K	L	M	N
M01	+	34.16	14.9	25.32	26.12	30.47	35.97	34.9	Nd	34.42	28.91	22.13	26.82	33.39	27.67
M01	+	33.56	16.56	25.10	26.14	30.24	36.07	35.06	Nd	34.14	28.54	22.31	26.81	33.65	27.90
M02	+	34.65	17.5	24.80	23.20	31.16	34.23	33.42	Nd	33.67	26.18	24.37	27.38	28.71	31.20
M02	+	34.45	15.89	24.79	23.12	30.73	34.25	33.19	Nd	33.37	26.64	24.44	27.42	28.68	31.06
M03	+	36.60	20.47	27.04	25.64	32.13	36.57	34.87	Nd	35.08	27.98	25.42	29.47	32.21	34.19
M03	+	35.99	20.76	27.07	25.91	32.87	36.46	35.07	Nd	35.19	28.35	25.63	29.66	31.65	33.60
M04	+	34.05	15.69	24.29	22.90	30.94	32.93	32.12	Nd	34.75	26.20	26.59	28.51	29.61	27.78
M04	+	32.70	18.97	24.26	22.86	31.26	33.34	32.16	Nd	34.47	26.67	26.39	28.48	30.1	27.83
M05	-	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	Nd	No Ct					
M05	-	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	Nd	No Ct					
M06	+	34.51	16.57	24.80	23.45	30.00	33.82	33.35	Nd	33.06	26.08	24.77	27.67	27.87	29.94
M06	+	33.66	15.85	24.77	23.44	30.10	33.7	33.35	Nd	32.86	26.22	24.53	27.67	27.91	29.99
M07	+	29.42	13.37	21.42	19.99	25.65	29.37	28.73	Nd	28.82	21.32	21.50	22.81	26.07	24.06
M07	+	27.98	14.18	21.35	20.18	25.80	29.51	28.6	Nd	28.83	21.63	21.46	22.77	26.21	24.06

\*El laboratorio H no utiliza en su química el reactivo ROX, no puede informar valores con treshold 0,1.

Tabla 6.4. Valores de Ct utilizando los valores de treshold propios usados rutinariamente por cada laboratorio participante en el Ring Test-BKD.

Muestra	Resultado esperado	Laboratorio													
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
M01	+	36.28	19.94	22.35	25.33	27.04	28.17	27.99	27.46	29.96	30.78	27.30	28.69	31.91	27.67
M01	+	36.10	20.18	22.15	25.27	26.85	27.84	28.36	27.31	28.76	30.66	27.37	28.69	32.43	27.90
M02	+	37.03	20.43	21.90	22.52	28.32	25.71	25.78	25.56	29.47	28.31	29.30	29.19	27.54	31.20
M02	+	37.10	20.05	21.87	22.46	27.42	25.8	25.80	25.51	28.60	28.68	29.40	29.19	27.49	31.06
M03	+	39.06	23.87	24.00	24.87	28.66	28.05	27.67	28.21	31.18	30.28	30.78	31.32	30.91	34.19
M03	+	38.36	23.59	24.09	25.15	29.57	28.54	27.59	27.96	29.99	30.56	30.87	31.47	30.37	33.60
M04	+	36.13	21.6	21.21	22.15	27.63	25.44	25.29	26.65	30.03	28.40	30.41	30.29	28.24	27.78
M04	+	35.38	20.95	21.28	22.08	28.26	25.19	25.32	26.57	29.62	28.90	30.25	30.25	28.76	27.83
M05	-	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
M05	-	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
M06	+	36.46	20.24	21.89	22.68	26.92	26.41	25.85	25.92	28.67	28.31	28.90	29.5	26.55	29.94
M06	+	35.99	18.53	21.87	22.64	27.13	25.99	26.10	25.53	28.32	28.55	28.95	29.51	26.84	29.99
M07	+	31.59	16.34	18.41	19.30	22.62	21.82	22.1	21.67	24.31	23.43	25.12	24.6	24.88	24.06
M07	+	30.82	17.02	18.35	19.54	22.81	21.88	21.71	21.25	24.40	23.76	25.32	24.53	24.93	24.06

#### 6.4. Análisis estadístico de la prueba de interlaboratorios

Para efectos del análisis estadístico se consideró como positivas todas aquellas muestras que presentaron valor de CT y como negativos aquellas que no arrojaron un valor de Ct (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Resultados positivos y negativos para calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica.

	Muestra		Total
	Positivo	Negativo	
Test +	147	0	147
Test -	9	26	35
Total	156	26	182

Sensibilidad: 94%, y se define como la capacidad de detectar a los verdaderos infectados (positivos)

Especificidad: 100%, capacidad de detectar a los verdaderos sanos o no infectados (negativos).

El test de concordancia indica que entre los laboratorios existe una buena concordancia en los resultados desde el punto de vista cualitativo como buena a muy buena (Tabla 6.6).

Valor Kappa=0,82

Error estándar Kappa 0,07

IC 95% 0,68-0,96

Tabla 6.6. Valores del test de concordancia (Kappa)

<i>Kappa</i>	<i>Estimación del grado de acuerdo</i>
<0	No acuerdo
0.0-0.2	Insignificante
0.2-0.4	Bajo
0.4-0.6	Moderado
0.6-0.8	Bueno
0.8-1.0	Muy bueno

**Tabla 6.7. Valores medios de Ct informados por cada Laboratorio usando sus propios valores de treshold.**

Nombre	Código	Ct de la muestra						
Laboratorio	Laboratorio	M01	M02	M03	M04	M05	M06	M07
ACUICOLA ALAS	A	33,9*	34,6*	36,3*	33,4*	No Ct	34,1*	28,7
ADL AYSÉN	B	15,7	16,7	20,6	17,3	No Ct	16,2	13,8
ADL PTO MONTT	C	25,2	24,8	27,1	24,3	No Ct	24,8	21,4
ADL VILLARRICA	D	26,1	23,2	25,8	22,9	No Ct	23,4	20,1
ANTARES	E	30,4	30,9	32,5	31,1	No Ct	30,0	25,7
AQUAGESTION AYSÉN	F	36,0	34,2	36,5	33,1	No Ct	33,8	29,4
AQUAGESTION PTO VARAS	G	35,0	33,3	35,0	32,1	No Ct	33,4	28,7
AQUAGESTION VILLARICA	H	27,4	25,5	28,1	26,6	No Ct	25,7	21,5
DIAGNOTEC	I	34,3	33,5	35,1	34,6	No Ct	33,0	28,8
ETECMA CASTRO	J	28,7	26,4	28,2	26,4	No Ct	26,2	21,5
ETECMA PTO MONTT	K	22,2	24,4	25,5	26,5	No Ct	24,7	21,5
FISHVETGROUP	L	26,8	27,4	29,6	28,5	No Ct	27,7	22,8
MARINE HARVEST	M	33,5	28,7	31,9	29,9	No Ct	27,9	26,1

\*Interpretado como negativo por el laboratorio.

La variabilidad de los valores de Ct por muestra usando valor de treshold de 0,1 de cada Lab se muestra en la figura 6.1.

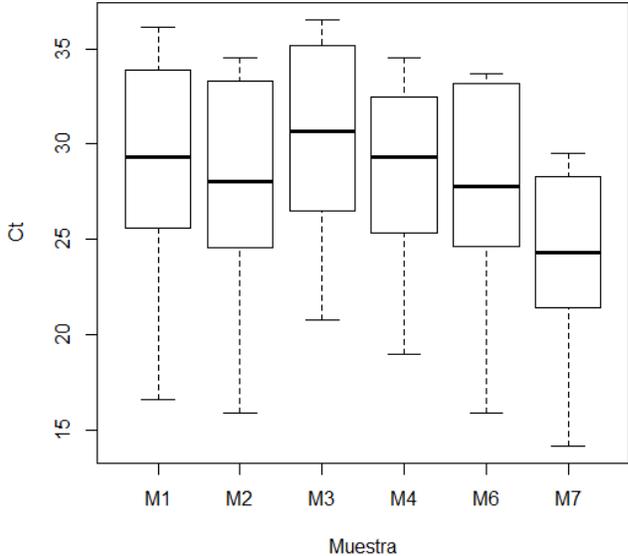


Figura 6.1. Variabilidad de los valores de Ct por muestra interlaboratorios usando un valor de treshold de 0,1.

Debido a que el laboratorio (H) en particular no utiliza en su química el reactivo ROX para normalizar los resultados de fluorescencia, no pudo informar los resultados usando el valor de treshold de 0,1 por lo tanto no aparece en la figura 6.2.

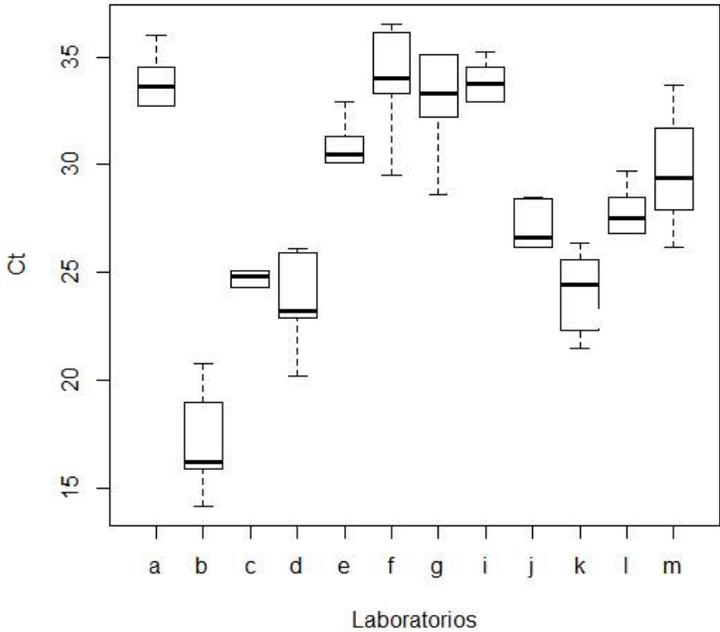


Figura 6.2. Variabilidad de los valores de Ct informados por los Laboratorios participantes del Ring Test-BKD según la muestra analizada.

#### **6.4. Discusión**

Esta alta variabilidad puede deberse a múltiples factores, entre los que se encuentran los diferentes equipos utilizados, la diferente química utilizada, los diferentes volúmenes de templado y de reacción utilizado, al segmento genético evaluado por cada laboratorio, entre otros. No obstante la gran variabilidad detectada, la totalidad de los laboratorios informaron valores de Ct para las muestras positivas y ausencia de señal para la muestra negativa. De los resultados podemos recomendar el uso de valores de Ct en una muestra en duplicado para informarla como positiva.

## Publicaciones

**Resúmenes de Congreso.** 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. Belfast, UK. 4-8 September 2017.

Dear Ricardo Enriquez,

I am pleased to confirm below the provisional presentation details of your accepted abstract(s) for the 18th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. The program may be subject to minor changes, so please check the online program regularly for updates . Please click [here](#) to view the up-to-date online program.

### Poster Presentations

Posters should be A0 in size and portrait in orientation. You are also encouraged to bring with you A4 copies of your poster presentation in order to facilitate the distribution of the information to interested delegates.

We look forward to seeing you in Belfast in September!

Kind regards

EAFP Scientific Committee

### Accepted Presentations

<b>Title</b>	Co-infection with three different aquatic viruses in fresh water Atlantic salmon reared in Chile
<b>Paper Number</b>	471
<b>Paper Reference</b>	221-P
<b>Paper Status</b>	Accepted for poster
<b>Session Details</b>	Poster - Salmonid Viral Diseases Sep 7, 2017 3:15 PM - 3:45 PM
<b>Presenting Author</b>	Dr Ricardo Enriquez

<b>Title</b>	Determination of Piscine Reovirus (PRV) incidence by RT-qPCR, according to histopathologic diagnose for farmed Atlantic salmon in fresh water, Chile
<b>Paper Number</b>	472

<b>Paper Reference</b>	230-P
<b>Paper Status</b>	Accepted for poster
<b>Session Details</b>	Poster - Aquatic Animal Epidemiology Sep 7, 2017 3:15 PM - 3:45 PM
<b>Presenting Author</b>	Dr Ricardo Enriquez

<b>Title</b>	Environmental and demographic factors associated with the detection of Piscine Orthoreovirus (PRV) in Atlantic salmon in fresh water, Chile
<b>Paper Number</b>	473
<b>Paper Reference</b>	231-P
<b>Paper Status</b>	Accepted for poster
<b>Session Details</b>	Poster - Aquatic Animal Epidemiology Sep 7, 2017 3:15 PM - 3:45 PM
<b>Presenting Author</b>	Dr Ricardo Enriquez

visit us online [www.eafp2017.com](http://www.eafp2017.com)



## ENVIRONMENTAL AND DEMOGRAPHIC FACTORS ASSOCIATED WITH THE DETECTION OF PISCINE ORTHOREOVIRUS (PRV) IN ATLANTIC SALMON OF FRESH WATER, CHILE



Rosenfeld<sup>1</sup> C., Bidart J<sup>1</sup>., Romero A.<sup>2,4</sup>, Smulders J P<sup>3</sup>, **Enríquez R.**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Universidad Austral de Chile; <sup>2</sup> Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile; <sup>3</sup> Instituto de Ciencia Animal, Universidad Austral de Chile; <sup>4</sup> Centro INCAR, Interdisciplinary Center for Aquaculture Research



### Introduction

Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) is a disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) described in salmon farming in Norway and recently in Chile, generating mortality in salmon in the initial sea phase. We describe the detection of Piscine Orthoreovirus (PRV) by RT-qPCR in some cases associated to HSMI in the marine phase and also in healthy fish in fresh and sea water. The objective of the study was to determine the association in PRV-positive Atlantic salmon with demographic and environmental factors in the freshwater production phase.

### Methodology

Samples of 700 Atlantic salmon were collected from 50 freshwater centers in 7 regions of Chile. The fish were fry, pre-smolt and smolt, maintained in open flow and recirculation systems. As independent variables (Table 1), environmental risk factors were considered as: Initial population at risk, incubation stage, water source, water flow system (open and recirculation) and geographical area. In addition, we considered demographic factors such as: nutritional status and the stage of development. Diseases detected in the last 6 months in each center were also considered. With all these data, a descriptive and multivariate analysis was carried out to establish the risk and protective factors, using the Mixed Generalized Linear Model, using the fish farm as a random variable and PROC GLIMMIX SAS software (Table 2). The detection of PRV was performed using the procedure described by Palacios *et al* (2010).



Figure 1. Number of fish farms/Region located in central and southern of Chile

Table 1. Frequencies of independent variables.

Categorical factors	Category	n°	%
<b>1.-Characteristics of the specimens</b>			
Initial population at risk	≥ 1.548.515	406	58,0
	<1.548.515	294	42,0
Incubation stage	Execution	322	46,0
	No execution	378	54,0
Development stage	Fry-Juvenile	266	38,0
	Pre smolts-Smolt	434	62,0
Weight gr	≥56 gr	342	48,8
	<56 gr	358	51,2
Nutritional status	Regular	196	28,0
	Good	504	72,0
<b>2.-Conditions of the water source</b>			
Affluent source	Rivers	350	50,0
	Others	350	50,0
Flow System	Open	476	68,0
	Recirculation	224	32,0
<b>3.-Geographical área</b>			
Region	Araucanía	224	41,1
	Los Lagos	322	58,9
<b>4.-Other diseases</b>			
Mycosis	With infection	560	80,0
	Without infect	140	20,0
BKD	With infection	70	10,0
	Without infect	630	90,0
Flavobacterium	With infection	420	60,0
	Without infect	280	40,0
IPN	With infection	210	30,0
	Without infect	490	70,0

### Results and Discussion

Table 2. Risk and protective factors of the final GLIMMIX model in *Salmo salar* positive to RT qPCR-PRV in freshwater phase.

Factors	Category	Frequency	OR	IC 95%		P-Value
				Inferior	Superior	
Initial population	≥ 1.548.515	406	0,58	0,38	0,91	0,01
	< 1.548.515	294				
Weight gr	≥56 grs.	342	2,04	1,3	3,0	0,0004
	<56 grs.	358				
Flow system	Open	476	0,28	0,16	0,47	<0,0001
	Recirculation	224				
Affluent source	River	350	1,78	1,13	2,81	0,0117
	Others	350				
Geographical Region	Araucanía	224	3,08	2,36	6,13	<0,0001
	Los Lagos	322				
BKD	Positive	70	16,1	5,8	44,4	<0,0001
	Negative	630				

- It was determined as protective factors, fish farms of greater population of fry smolts, as well as those that use open water flow.
- In regard to risk factors, it was determined that fish weighing more than 56 g are 2 times more likely to have PRV infection, as well as those fish farms that are supplied with river water and have concomitant infections with BKD and mycosis.
- Finally, differences of up to three times in the possibility of presenting PRV infections were determined, depending on the origin of the fish.

### Conclusions

The occurrence of PRV would increase in the freshwater phase, with populations above 1.5 million Atlantic salmon, in open flow systems and regular nutritional status, with mycosis and BKD in the last 6 months.

REFERENCES: Palacios G, et al., 2010. Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus. PLOS ONE 5(7): e11487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011487>

### ACKNOWLEDGEMENTS

- This study was funded by the Subsecretaría de Pesca, Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura (Proyecto FIP 2014-61).



## DETERMINATION OF PISCINE ORTHOREOVIRUS (PRV) INCIDENCE BY RT-qPCR, ACCORDING TO HISTOPATHOLOGIC DIAGNOSE FOR ATLANTIC SALMON FARMED IN FRESH WATER, CHILE

Rosenfeld<sup>1</sup> C., Bidart J.<sup>1</sup>, Romero A.<sup>2,3</sup>, Navarrete M. J.<sup>2</sup>, Enríquez R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Universidad Austral de Chile; <sup>2</sup> Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile; <sup>3</sup> INCAR, Interdisciplinary Center for Aquaculture Research



### Introduction

Aquaculture is the fastest growing food production industry in the world. However, this increase is being accompanied by an increase in infectious diseases (Finstad *et al* 2012), one of which is the Cardiac and Skeletal Muscle Inflammation Disease (HSMI) described in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with recent findings in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Coho salmon (*O. kisutch*). The objective of the study was to determine the presence of Piscine Orthoreovirus (PRV) and establish the prevalence using RT-qPCR using 3 levels of Ct according to histopathological diagnosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in freshwater phase.

### Methodology

Heart and skeletal muscle samples were collected from an Atlantic salmon population (*Salmo salar*) from 50 freshwater centers of 7 Regions of central and southern of Chile, from the fry stage to smolt (fry, pre-smolt and smolt) with a total of 700 fishes (Figure 1). The centers are supplied with open flow and recirculation systems. The information was obtained through the FIP 2014-61 Project. During the sampling, SERNAPESCA officials conducted an interview with the heads of the centers applying a survey. The detection of PRV was performed using the procedure described by Placios *et al.*, (2010).

### Results and Discussion

Table 1. Proportion of *Salmo salar* positive and negative according to cut-off value of RT qPCR-PRV.

Ct	Sample								
	33			35			40		
	n°	%	IC 95%	n°	%	IC 95%	n°	%	IC 95%
Positive	302	43,3	(39,4-46,9)	354	50,6	(46,8-54,3)	452	64,6	(60,8-68,0)
Negative	150	21,4	(18,4-24,6)	98	14	(11,5-16,8)	0	0	(0,0-0,0)
Without Ct	248	35,4	(31,9-39,1)	248	35,4	(31,9-39,1)	248	35,4	(31,9-39,1)
Total	700	100	(99,3-100)	700	100	(99,3-100)	700	100	(99,3-100)

Table 2. Skeletal muscle and heart histological alterations according to Ct value RT qPCR-PRV.

Skeletal muscle alterations	Degeneration		Linfocite infiltration	
	n°	Ct (min.-máx.)	n°	Ct (min.-máx.)
Strong, Difusos	0	-	0	-
Moderate, Difusos	0	-	0	-
Moderate	0	-	0	-
Small, Difusos	0	-	0	-
Small	0	-	0	-
Without alterations	25	20,9-31,0	25	20,9-31,0
Total	25	20,9-31,0	25	20,9-31,0

Heart alterations	Epicarditis		Miocarditis	
	n°	Ct (min.-máx.)	n°	Ct (min.-máx.)
Strong, Difusos	2	20,9-21,8	2	20,9-21,8
Moderate, Difusos	0	-	2	21,1-22,8
Moderate inflammation in esponjous layer y moderate degeneration de myocytes	0	-	1	29,9
Moderate	3	22,9-26,3	0	-
Small, Difusos	2	21,1-22,8	2	22,9-24,6
Small Multifocal, layer esponjous	0	-	1	24,6
Small	6	21,3-31,0	1	21,3
No alterations	12	20,9-29,9	16	20,9-31,0
Total	25	20,9-31,0	25	20,9-31,0

### Conclusions

From the epidemiological point of view regarding the positivity of PRV without clinical manifestation in fresh water, it was not possible to relate heart and skeletal muscle histological damage with Ct value. The need to study the effects through the follow-up of a fry cohort (PRV +) to evaluate in the marine phase the evolution of the viral load and to establish the value of Ct with diagnostic significance and its association with the possible outbreaks of HSMI its necessary.

REFERENCES: Palacios G, *et al.*, 2010. Heart and Skeletal Muscle Inflammation of Farmed Salmon Is Associated with Infection with a Novel Reovirus. PLOS ONE 5(7): e11487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011487R>

#### ACKNOWLEDGEMENTS

• This study was funded by the Subsecretaría de Pesca, Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura (Proyecto FIP 2014-61).



Figure 1. Number of centers by región located in central and southern of Chile.

The results obtained detail the Piscine Orthoreovirus (PRV) in the freshwater production phase of Chile, based on the high positivity to RT-qPCR between 43.3% (IC 39.4-46.9), 50.6% (CI 46.8-54.3) to 64.6% (60.8-68.0) depending on the Ct value used 33, 35 and 40, respectively, without associated mortality or signs of HSMI. We found Ct indicating high concentration of genetic material (Ct min 19.4 and median 28.9 and 29.8) (Table 1 and figure 2). These results do not allow us to corroborate what has been described by other investigators, who point out that the burden of the virus is related to the disease, and therefore with histological characteristic lesions of HSMI. Nevertheless, it is confirmed what has been described in other investigations, that it is expected to find no lesions, even in fish positive to RT-qPCR.

From the heart histopathological analysis, the observed lesions vary according to the case, but most myocarditis occurred in the compact layer of the myocardium with low Ct values 20,9-24,6. No type of injury was observed in skeletal muscle, probably because the muscle injury occurs later in HSMI (Table 2).

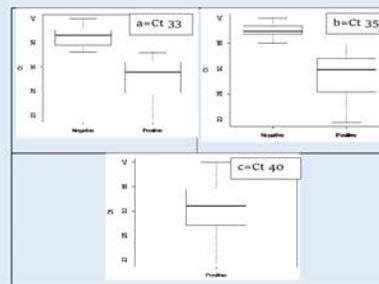


Figure 2. Ct values of healthy *S. salar* as a function of the cut off of 33 (a), 35 (b) and 40 (c)



## CO-INFECTION WITH THREE DIFFERENT AQUATIC VIRUSES IN FRESH WATER ATLANTIC SALMON REARED IN CHILE



Peña Rehbein, P.<sup>1,2</sup>, Vargas, A.<sup>2,3</sup>, Romero, A.<sup>2</sup>, Enríquez, R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Doctoral Programme in Veterinary Science, Faculty of Veterinary Science, Graduate School, Universidad Austral de Chile.

<sup>2</sup> Biotechnology and Aquatic Pathology Laboratory, Faculty of Veterinary Science, Universidad Austral de Chile.

<sup>3</sup> INCAR, Interdisciplinary Center for Aquaculture Research

### INTRODUCTION

Co-infections are very common in nature (Rodríguez *et al* 2005, Tao *et al* 2007), in salmonids different viral co-infections have been described (Kibenge *et al* 2000, Skotheim 2009, Mikalsen *et al* 2014). Piscine Orthoreovirus was recently described in Chile and Atlantic Salmon Calicivirus (ASCV) as well. IPNV has a high prevalence in fresh water, and is necessary to elucidate the relations between these 3 viruses in healthy fresh water Atlantic salmon reared in Chile.

### OBJECTIVES

The aim of this study was to describe the co-infection of Piscine Orthoreovirus (PRV), Atlantic Salmon Calicivirus (ASCV) and Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Atlantic salmon of fish farms located in central and southern of Chile.

### MATERIAL AND METHODS

Healthy Atlantic salmon samples were collected from 24 different hatcheries of the following Regions of Chile; Metropolitana, Maule, La Araucanía, Los Ríos, Los Lagos and Aysen. Twelve fishes without clinical signs of diseases and over 50 g were collected from each hatchery. Fish were killed using an overdose of anesthesia. Organs for analysis were collected preventing contamination between samples and stored in RNA-Later® until PCR analysis. RNA extraction was performed by EZNA® Total RNA Kit I. All PCR was performed in Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems), for IPNV and ASCV RT-PCR Sybr Green and for PRV RT-qPCR was performed.

Primers used for PRV detection were L1 Reverse (5-TGC TAA CAC TCC AGG AGT CAT TG-3), L1 Forward (5-TGA ATC CGC TGC AGA TGA GAT-3), L1 Probe (5-FAM CGC CGG TAG CTC T-MGBNFQ-3); for IPNV were VP2 Reverse (5-CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG-3) and VP2 Forward (5-CCG CAA CTT ACT TGA GAT CCA TTA TGC-3); and for ASCV were Forward (5-GGT TGC CTA CTT TCC ACC AA-3), Reverse (5-CGT TAG TTG GAT GCC ACA AG-3).

### RESULTS AND DISCUSSION

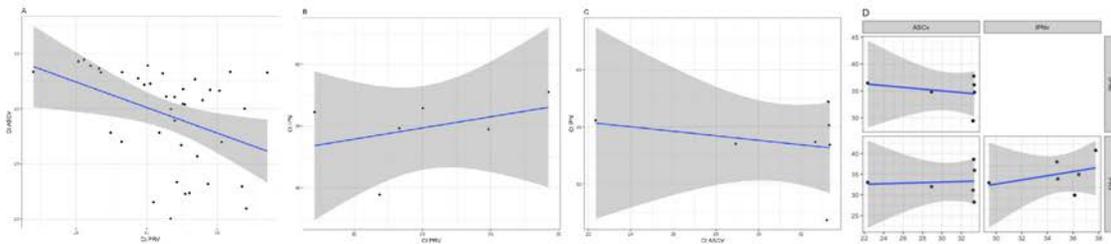
In healthy Atlantic salmon from different Chilean hatcheries (fry, pre-smolts, smolts), Piscine Orthoreovirus (PRV), Atlantic salmon Calicivirus (ASCV) and Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) were detected by RT-qPCR. Prevalence for PRV was 40%, ASCV 21% and IPNV 9%. Co-infection between PRV, ASCV and IPNV occurs in 8% of cases.

The co-infection only with PRV and ASCV (figure 1A) was negative ( $R=-0.39$ ), and can be interpreted as an antagonist effect (Wiik-Nielsen *et al* 2016) between both viruses when they infect healthy fishes. The co-infection between ASCV and IPNV (figure 1C) shows a negative correlation ( $R=-0.25$ ) and can be interpreted like PRV-ASCV coinfection. In the case of PRV and IPNV co-infection (figure 1B) the correlation was positive ( $R=0.38$ ), therefore it can be interpreted as a synergic effect between these viruses.

When the fishes were simultaneously (triple) co-infected with PRV, ASCV and IPNV (figure 1D), only the relationship (correlation) between ASCV and PRV changed to "weak positive" ( $R=0.08$ ).

### CONCLUSIONS

- In single co-infections (ASCV-PRV or ASCV-IPNV), Atlantic salmon Calicivirus can alter the replication of PRV and IPNV in Atlantic salmon. ASCV has an antagonist effect with PRV and with IPNV. In the other hand PRV has a synergic effect with IPNV.
- In simultaneous (ASCV-PRV-IPNV) co-infections, only the relationship between ASCV and PRV changed to "weak positive", PRV-IPNV and ASCV-IPNV has no change.
- This results shown an interaction between these three viruses when they co-infect a single Atlantic salmon.



**Figure 1.** Bivariate Ct value plots for different viral coinfections in healthy fresh water Atlantic salmon. A) Correlation between PRV and ASCV co-infections. B) Correlation between PRV and IPNV co-infections. C) Correlation between ASCV and IPNV co-infections. D) Correlations between viral associations in co-infection with PRV, ASCV and IPNV.

### REFERENCES

- Kibenge, F.S.B., Whyte, S.K., Hammell, K.L., Rainnie, D., Kibenge, M.T., Martin, C.K., 2000. A dual infection of Infectious salmon anaemia (ISA) virus and a Togavirus-like virus in ISA of Atlantic salmon *Salmo salar* in New Brunswick, Canada. *Dis Aqua Org* 42, 11-15.
- Mikalsen, A.B., Nilsen, P., Frøystad-Saugen, M., Lindmo, K., Eliassen, T.M., Rode, M., Evensen, Ø., 2014. Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Proposal for a New Genus of Caliciviridae. *PLoS ONE* 9, e107132.
- Rodríguez, S., Alonso, M., Perez-Prietol, S.I., 2005. Comparison of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Dis Aqua Org* 67, 183-190.
- Skotheim, S.A., 2009. Co-infection with Norwegian Salmonid Alphavirus (NSAV) and Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Chinook Salmon Embryo Cells (CHSE-214). The University of Bergen, Bergen, Norway.
- Tao, J.-J., Gui, J.-F., Zhang, Q.-Y., 2007. Isolation and characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish. *Aquaculture* 262, 1-9.
- Wiik-Nielsen, J., Alarcon, M., Jensen, B.B., Haugland, O., Mikalsen, A.B., 2016. Viral co-infections in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., displaying myocarditis. *J Fish Dis* 39, 1495-1507.

### ACKNOWLEDGEMENTS

- This study was funded by the Subsecretaría de Pesca, Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura (Project FIP 2014-61) and CONICYT Doctoral Grant.

## Piscine Orthoreovirus (PRV) y su asociación a factores demográficos y ambientales en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) en fase de agua dulce y descripción de HSMI



\*Rosenfeld, C., J. Bidart\*, P. Peña, M.J. Navarrete, M. Monrás, V. Quinteros, A. Vargas, I. Aguirre, A. Romero, R. Enriquez.  
\*Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile. renriquez@uach.cl

### Introducción

La Inflamación del Músculo Cardíaco y Esquelético (HSMI) es una enfermedad de salmón del Atlántico en fase marina de cultivo y se ha identificado en Noruega y Chile, entre otros países. HSMI tiene una etiología viral producida por un Piscine orthoreovirus (PRV), que afecta principalmente el músculo cardíaco y esquelético. Por lo general es una enfermedad de mortalidad moderada (hasta 20 %) pero con una alta morbilidad (100 %), y se presenta en Noruega entre 5 a 9 meses después del traslado al mar. De dos estudios realizados en Chile en centros de mar, se determinó que PRV se encuentra presente en la especie *Salmo salar* en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes, así de los 26 centros seleccionados, 20 presentaron resultados positivos a PRV mediante RT-PCR, lo que corresponde al 72% de los centros muestreados. En los peces que se detectó PRV, no se determinó la presencia de lesiones ni mortalidad asociada a HSMI. En función de los antecedentes de los estudios anteriores, se evidencia la necesidad de ampliar el estudio a los centros en la fase de producción en agua dulce, para verificar o descartar la presencia de Piscine Reovirus (PRV) en esta etapa del ciclo de producción. El Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura de la SUBPESCA licitó el proyecto FIP N° 2014 – 61: Estudio en epidemiología y técnicas de diagnóstico para enfermedades exóticas o emergentes con énfasis en Piscine Reovirus (PRV) y *Renibacterium salmoninarum* (BKD), que fue adjudicado por Lab de Biotecnología y Patología Acuática-UACH.

### Antecedentes de Piscine Orthoreovirus (PRV)

Piscine orthoreovirus (PRV) es un virus recientemente descrito (Palacios et al 2010) asociado a la enfermedad inflamación del músculo cardíaco y esquelético (HSMI). Pertenecer a la familia *Reoviridae*, nombre que deriva de *respiratory enteric orphan*, siendo considerados como "huérfanos" por encontrarse en tractos respiratorios y gastrointestinales, pero no asociados a enfermedades (Sabin 1959).

La familia *Reoviridae* está compuesta por 15 géneros y dividida en dos subfamilias. La subfamilia *Spinareovirinae* (contiene espinas en cada uno de los doce vértices del virus o núcleo)

y *Sedoreovirinae* (no contiene proyecciones en superficie, con apariencia esférica o suavizada) (Attoui et al 2011).

Piscine orthoreovirus se encuentra altamente distribuido en salmón del Atlántico, presente en trucha y salmón coho y en distintas especies marinas (Palacios et al 2010, Garseth et al 2013a, b, Godoy et al 2016), detectado en distintos países productores de salmónidos como Noruega, Canadá, Irlanda, Dinamarca, USA y Chile (Kibenge et al 2013, Rodger et al 2014, Kibenge and Godoy 2016, Garver et al 2016).

### 1. Etiología

Los reovirus son icosaédricos pero tienen apariencia esférica, son de tamaño entre 60 a 85 nm de diámetro, sin envoltura y poseen entre una a tres capas concéntricas de proteínas de cápside que rodean los segmentos dsRNA lineales de genoma viral (Attoui et al 2011).

Piscine orthoreovirus posee 10 segmentos de RNA doble hebra, tres segmentos L, tres segmentos M y cuatro segmentos S. Todos los segmentos génicos contienen los nucleótidos terminales 3' (UCAUC-3', comunes para orthoreovirus y aquareovirus) pero los nucleótidos terminales 5' son únicos (5'-GAUAAA/U) (Palacios et al 2010, Attoui et al 2011, Kibenge and Godoy 2016).

Kibenge et al (2013) usando análisis filogenético agrupó los aislados noruegos de PRV en el genotipo I, los aislados canadienses de PRV fueron agrupados en el subgenotipo Ia y los aislados chilenos en el subgenotipo Ib. Las cepas de PRV de salmón coho son más diversificadas genéticamente, clasificando algunas de ellas en el genotipo Ia y otras Ib, así como en el genotipo II junto con el virus PRV-like asociado a trucha arcoiris en Noruega (Olsen et al 2015, Godoy et al 2016).

### 2. Patogenia

Los reovirus replican en el citoplasma celular y al igual que los virus de genoma con sentido negativo y cadena simple de RNA, transportan sus propias enzimas para replicación, debido a que

## Encuestas HSMI/BKD fase de agua dulce y de mar.

### Resultados

Hasta el momento, se ha recepcionado 1 sola encuesta de HSMI, y de BKD solo de 6 centros de agua dulce y 35 centros de mar, de los cuales 20 presentaron brote de BKD.

De los centros con BKD, 19 producen salmón Atlántico y 1 trucha arco iris. El 85% de los centros se encuentran en la Región de Magallanes y el 15% en Aysén. Los pesos de los peces afectados fluctuaron entre 74 a 2.101 gr, con un promedio de 386 gr. El 100% del origen de los peces corresponden a ovas nacionales.

De acuerdo a la información obtenida hasta el momento no se puede realizar un análisis para la determinación de factores de riesgo, debido al bajo número de encuestas obtenidas tanto de los centros con casos como de centros sin brote.

### Diseño de encuestas

#### Encuesta epidemiológica centro de cultivo de salmones con brote/s de PRV/BKD, en agua dulce.

<b>Nombre centro:</b>	<b>Código:</b>	<b>Fecha:</b>
<b>Med. Vet. Inspector:</b>	<b>Nombre y cargo encuestado:</b>	

<b>I.- Antecedentes Generales.</b>			
1.-Actividad(es) del centro de cultivo (marque con una X una o más alternativas)			
a) Incubación _____	b) Alevinaje _____	c)Smoltificación _____	d)Reproducción _____ e)Engorda _____
e)Especie/s: S. atlántico _____ T. Arco Iris _____ S. coho _____			
f) N° de Unidades Epidemiológicas: _____ ¿Cuáles? _____			
g)Origen de los peces: Cultivo de peces propio _____ de tercero _____			
2-Fuente de abastecimiento de agua (marque con una X una o más alternativas)			
a)Origen Río__ Lago__ Mar__ Pozo__ Vertiente_____	b)Sistema de flujo del agua Abierto____ Cerrado _____ Mixto _____		
Observación descripción de sistemas complejos. N° jaulas N° lotes			
<b>II.-Técnicas y métodos de desinfección de afluentes y efluentes y sus modos de control. (marque con una X una o más alternativas)</b>			
1.- Desinfección de Afluente No _____ Si _____ Unidad/es Epidemiológica/s: _____			
a)Ozono Si _____ No _____	b)Ultravioleta Si _____ No _____	c)Otro _____ ¿Cuál?	
2.-Desinfección de Efluentes Si _____ No _____ Unidad/es Epidemiológica/s:			
a)Ozono Si _____ No _____	b)Ultravioleta Si _____ No _____	c)Otro	¿Cuál?
Observaciones:			
<b>III.- Características del centro (rellene o marque con una X una o más alternativas).</b>			

1.-Estanques o balsas jaulas:									
a)Número total estanques _____ b)Número estanques poblados o en operación _____ c)Número total de peces _____									
d) Peso prom. peces centro _____ e)Número total de peces ingresados en los últimos 6 meses: _____									
Observaciones:									
2-Registro cronológico de los ingresos de peces al centro y sus pesos promedios (base de datos) últimos 6 meses.									
	Centro de origen	Código	Fecha	Número de peces	Peso promedio	N° lote			
1									
2									
3									
4									
5									
3.-Origen de las ovas <b>CON brote</b> (loteo hatchery) a)nacional _____ b) importado _____ c)QTL Si ___ No ___									
d)Cepa/s de las ovas _____									
Origen de las ovas <b>SIN brote</b> (loteo hatchery) a)nacional _____ b) importado _____ c)QTL Si ___ No ___									
d) Cepa de las ovas _____									
Observaciones:									
4.-Reproductores screening fue hecho en: Pooles _____ Individual _____ con Ct PCR _____ sin Ct PCR _____									
Nombre laboratorio informante: _____									
5.-Total de batch con reproductores _____ n° reprod. Con BKD _____ Total batch con reprod. con BKD _____									
<b>5.-SALA/Jaula DEL CENTRO:</b> N° total _____ Indique que salas se les realizó las siguientes actividades:									
	N° Estanques	Ingresos año	N° peces	Especie	Pesos prom.	N° salidas / sala año	N° manejos grupos peces	N° de estanques limpios/hig. previo ingreso de peces últ. Año	N° de estanques en brote por salas
SALA 1									
SALA 2									
SALA 3									
SALA 4									
SALA 5									
Observaciones:									
<b>6.-Descansos y limpieza y desinfección</b>									
a)Días de descanso previo al ingreso de los peces _____									
b) La limpieza e higienización de estanques lo realiza: Propio centro ___ Empresa externa ___									

Nombre empresa _____								
c) Al finalizar la etapa de producción se desarma la tubería para realizar la limpieza/hig. Sí ___ No ___								
d) La tubería de los estanques poseen codo/s que generan acumulación de agua cuando éstos están vacíos Sí ___ No ___								
e) Al finalizar la etapa de producción realiza: Renovación del biofiltro _____ Limpieza de biofiltro _____ No aplica _____								
<b>IV.- Condiciones ambientales: ( indique los eventos en los últimos 3 meses antes del brote)</b>								
Fecha	Temporales antes del brote	Presencia de aguas turbias			Bajas de oxígeno	%Mort. acumulada		
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
<b>V.- Información de los casos de brotes:</b> N° estanques en brote _____ (en lo posible base de datos)								
Sala/estanque/lote con brote presenta mortalidades por causa de PRV/BKD superior a 0,02% diario o un 2% acumulado en un n ≤ 5 días								
Fecha inicio brote	Sala	Id. lote	Id. Estanque	Temperatura del agua	% mortalidad	Peso prom. Peces	Especie	Estado de desarrollo
1				Prom. ___ min. ___ max. —				
2				Prom. ___ min. ___ max. —				
3				Prom. ___ min. ___ max. —				
4				Prom. ___ min. ___ max. —				
5				Prom. ___ min. ___ max. —				
6				Prom. ___ min. ___ max. —				
Año/s o meses anteriores con brote/s de PRV/BKD: n° veces _____ años _____ meses _____ peso prom. Aprox.								
<b>VI.- Características de los estanques o balsa jaula:</b>								
	Antecedentes de estanques Con brote				Antecedentes de estanques Sin brote			
1.- Dimensiones y M <sup>3</sup> de capacidad								
2.- Forma								
3.- Ubicación								
4.- Densidad (Kg/m <sup>3</sup> )								
5.- Densidad (peces/m <sup>3</sup> )								
6.- ¿Se realizó algún cambio antes del brote? Sí _____ No _____ ¿Cuál? _____								
<b>VII.- Haga un dibujo o layout de los estanques o balsas jaulas identificándolos e indicando aquellos con brote.</b>								

--

**VIII.-Antecedentes de los centros de agua dulce de procedencia: Ingresos**

Código del centro de procedencia	Id. del lote	N° peces	Antecedentes de brote/s de PRV en etapa de producción anterior
1			Si ___ No ___
2			Si ___ No ___
3			Si ___ No ___
4			Si ___ No ___
5			Si ___ No ___

**IX.-Vacunaciones**

1.-Vacunas previo a ingreso al centro:                      Tipo de vacuna:                      Laboratorio de vacuna:

2.-UTA acumuladas desde la vacunación (al momento del brote actual):

3.-Número de peces vacunados y lotes de origen: (indique la siguiente información).

Nombre Vacuna	Laboratorio	Lote	Fecha Inicio	Fecha termino	Núm. vacunados	Vía adm.	Brote
							Si ___ No ___
							Si ___ No ___
							Si ___ No ___
							Si ___ No ___
							Si ___ No ___

Observaciones:

**X.- Antecedentes del alimento en el centro con brote:**

a)Principal proveedor de alimento (marca)                      b)Dietas funcionales                      Si \_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_  
No \_\_\_

c)¿Se realizó cambio de alimento antes del brote? No \_\_\_ Si \_\_\_ ¿Cuándo? \_\_\_\_\_  
¿Qué cambio? \_\_\_\_\_

**XI.-Identificación de eventos de estrés de manejo productivo y ambiental previo (días hasta 12 y más sem.) al brote de PRV/BKD: (de preferencia la fecha específica):**

Eventos	N° estanque/s afectados por eventos	Identif. estanques afectados eventos	Días antes del brote	1 a 3 sem.	4 a 8 sem.	≥12 sem.

Manejo tipo (ej. ayuno, vacunaciones, cambios de temperatura, etc.). ¿Cuál/es?						
Temporales acumulados previo al brote						
Baja oxígeno acumulado previo al brote						
Ataque de pájaros acumulados previo al brote						
Tratamientos (con sal)						
Número total eventos estresantes acumulados previo al brote						
Durante el brote maneja la temperatura para bajar /parar la mortalidad en el brote o algún otro manejo: No__ Si__ ¿Cómo?						

### Encuesta epidemiológica centro de cultivo de salmones con brote/s de PRV/BKD, agua de mar.

<b>Nombre centro:</b>	<b>Código:</b>	<b>ACS:</b>	<b>Fecha:</b>
<b>Med. Vet. Inspector:</b>		<b>Nombre y cargo encuestado:</b>	
<b>I.- Antecedentes Generales.</b>			
1.-Actividad(es) del centro de cultivo (marque con una X una o más alternativas)			
Engorda____ b) Reproductores____ c) Crec. reproductores____ d) Especie/s: S. atlántico ____ T. Arco Iris____ S. coho ____			
Descripción de sistemas complejos.			
Densidad de siembra____ Núm. peces por jaula n°/mt <sup>3</sup> ____			
<b>II.-Características del centro de mar (marque con una X una o más alternativas):</b>			
a) Profundidad a la que se encuentra el centro____		b) Principal del centro____	
c)Traslado para la siembra se realiza por : Camión____ Barcos ____ indique si es de uso: exclusivo____ compartido____			
<b>Mallas (marque con una X una o más alternativas):</b>			
1.-Características de las mallas: a) Tipo de malla: Cobre____ Nylon____ Poliéster ____ b) Impregnada Sí ____ No ____ c)Por lavado in situ____ frecuencia lavado ____d) Mandan a lavar____ frecuencia lavado____ e) Empresa que lava ____			
Observaciones:			
2.-Traslado de las mallas para la siembra se realiza por : Camión ____ Barcos ____ indique si es de uso: exclusivo____ compartido____			
3.- La limpieza y desinfección del medio de transporte se: No verifica____ Se verifica ____ indique ¿Cómo?_____			
4.- Profundidad de las mallas (promedio del centro) a la recepción de los peces _____			
5.-Al ingresar los peces al centros se realiza con las mallas instaladas: Si (todas instaladas) ____ o en instalación____			
6.-Peso promedio de los peces centro cuando se realiza el primer cambio de profundidad de mallas_____			

7.-Registro cronológico de los pesos promedios y fechas del centro cuando se realiza cambio de apertura nudo de malla:								
Peso promedio	Fecha	Calibre de apertura de malla						
1								
2								
3								
4								
5								
8.-El centro realizó cambio o limpieza de malla durante ciclo productivo Sí ___ No ___ ¿Cuándo? _____								
9.-¿Cuántos lavados fueron realizados (mallas sin impregnar)? n° _____								
<b>III.- Condiciones ambientales, indique los eventos en los últimos 3 meses antes del brote.</b>								
Fechas	Cierres de puerto durante el ciclo productivo	Presencia de bloom (FAN) durante el ciclo productivo	Bajas de oxígeno durante el ciclo productivo	Ataque de lobos	% Mortalidad acum.			
1								
2								
3								
4								
5								
6								
<b>IV.-Origen de los peces:</b> (Brote: Presenta mortalidades durante el ciclo productivo por causa de PRV/BKD).								
1.-Ovas <b>CON brote</b> (lote o hatchery) a) nacional ___ b) importado ___ c) QTL Si ___ No ___ d)Cepa/s de las ovas _____								
2.-Ovas <b>SIN brote</b> (lote o hatchery) a) nacional ___ b) importado ___ c) QTL Si ___ No ___ d) Cepa/s de las ovas _____								
Observaciones:								
5.-Antecedentes previos de los peces con PRV/BKD en agua dulce Sí ___ No ___								
6.-Jaulas del Centro: N° total jaulas _____ N° total de batch _____								
Identificación del Batch	Fecha inicio siembra	Fecha de término siembra	Especie	N° Jaulas	N° peces	Pesos prom.	N° manejos por batch de peces	N° de jaulas en brote por batch de peces
Observación								
<b>V.- Información de los casos de brotes:</b> N° jaulas en brote ___ (en lo posible base de datos) Jaula/batch con brote presenta mortalidades por causa de PRV/BKD								

Fecha inicio brote	Id. batch	Id. jaula	T° agua	% mortalidad	Peso prom. Peces	Especie	Estado de desarrollo
1			Prom. ___ min. ___ max. ___				
2			Prom. ___ min. ___ max. ___				
3			Prom. ___ min. ___ max. ___				
4			Prom. ___ min. ___ max. ___				
5			Prom. ___ min. ___ max. ___				
6			Prom. ___ min. ___ max. ___				
Año/s o meses anteriores con brote/s de PRV: n° veces _____ años _____ meses _____ peso prom. Aprox.							
<b>VI.-Características de las balsa jaula:</b>							
	Con brote			Sin brote			
1.- Dimensiones y m³ de capacidad							
2.-Forma							
3.-Ubicación							
4.-Densidad (Kg/m³)							
5.- Densidad (peces/m³)							
6.- ¿Se realizó algún cambio antes del brote? Sí _____ No _____ ¿Cuál? _____							
<b>VII.-Haga un dibujo o layout de las balsas jaulas identificándolas e indicando aquellas con brote.</b>							

VIII.-Antecedentes de los centros de agua dulce de procedencia: Ingresos presencia de otras enfermedades							
Código del centro de procedencia	Especie	Id. del lote/batch	N° peces	Antecedentes de enfermedades en etapa de producción anterior.			
1				Si _____ cual _____ No _____			
2				Si _____ cual _____ No _____			
3				Si _____ cual _____ No _____			
4				Si _____ cual _____ No _____			
IX.-Vacunaciones							
<b>Vacunas previo a ingreso al centro:</b>		Tipo de vacuna:		Laboratorio de vacuna:			
UTA acumuladas desde la vacunación (al momento del brote actual) _____			Uso de booster vacuna en mar No ___ Si ___ ¿cuál? _____				
Número de peces vacunados y lotes de origen: (indique la siguiente información).							
Nombre Vacuna	Laboratorio	Lote/ Batch	Fecha Inicio	Fecha termino	Núm. vacunados	Vía adm.	Brote
1							Si ___ No ___

2								Si___ No___
3								Si___ No___
4								Si___ No___
5								Si___ No___
6								Si___ No___
7								Si___ No___
Observaciones:								

**X.- Antecedentes del alimento en el centro con brote:**

Principal proveedor (marca) de alimento \_\_\_\_\_ Dietas funcionales ¿Cuál? \_\_\_\_\_  
 No\_\_\_

¿Se realizó cambio de alimento antes del brote? No \_\_\_ Si \_\_\_ ¿Cuándo? \_\_\_\_\_ ¿Qué cambio?  
 \_\_\_\_\_

Observaciones:

**XI.- Identificación de eventos de estrés de manejo productivo y ambiental previo (días hasta 12 y más sem.) al brote de PRV/BKD:  
 (de preferencia la fecha específica):**

Eventos	N° jaula/s afectadas eventos	Id jaulas afectadas eventos	Días antes del brote	1 a 3 sem.	4 a 8 sem.	≥12 sem.
Manejo tipo (ej. ayuno, vacunaciones, etc.) ¿Cuál/es?						
Temporales acumulados previos al brote (daño mecánico).						
Baja oxígeno acumulado previo al brote						
Ataque de pájaros acumulados previo al brote						
Ataque de lobos acumulados previo al brote						
Número total eventos estresantes acumulados previo al brote						

## **ANEXOS**

### **Anexo 1: Reuniones de coordinación y avance**

- **Actividad: Reunión de coordinación:** Se efectuó la reunión de coordinación de las actividades con la contraparte técnica del estudio, el Consejo de Investigación Pesquera y Acuicultura y SubPesca el día 09.06.2015 en dependencias de FIPA en Valparaíso. Se adjunta copia del acta. Temas de la reunión: Se explicó lo relevante del plan de trabajo, las metodologías y los procedimientos importantes. En resumen, se precisaron aspectos del objetivo 1, específicamente la secuenciación de los productos de PCR de los resultados relevantes y la inoculación de enfermedades sindrómicas, considerando SIT. Del objetivo 2 SERNAPESCA enviará la información de los centros de reproductores para determinar el diseño de muestreo y el periodo de estudio. En principio quedó para la temporada de reproducción del 2016. El estudio epidemiológico de PRV en smolt ya está realizado, se adjuntará esta información al proyecto FIP y se propuso realizar con estas muestras un estudio de prevalencia de Calicivirus. Del objetivo 4, se presenta una dificultad ya que el antisero necesario para validar la IFAT-BKD no estaría disponible, posteriormente se realizó una búsqueda internacional. En el objetivo 5, del estudio epidemiológico de BKD se consideran salmón del Atlántico, salmón coho y trucha arco iris. Del objetivo 6, se acuerda realizar el Ring Test para BKD, sin embargo, por los casos de PRV/HSMI que se han presentado es necesario reevaluar esta decisión y ejecutarlo para PCR-PRV.

#### **- Actividad: Reuniones de avance**

Se adjuntan las actas de las reuniones de avance realizadas en FIPA Valparaíso.

Acta Primera Reunión de Coordinación Proyecto FIPA 2014-61

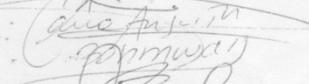
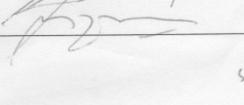
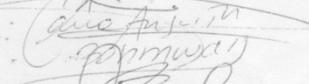
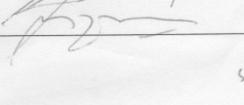
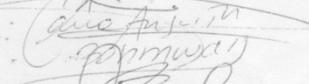
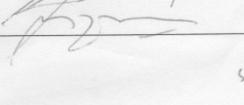
FECHA: 09 de junio 2015

LUGAR: FIPA, Valparaíso

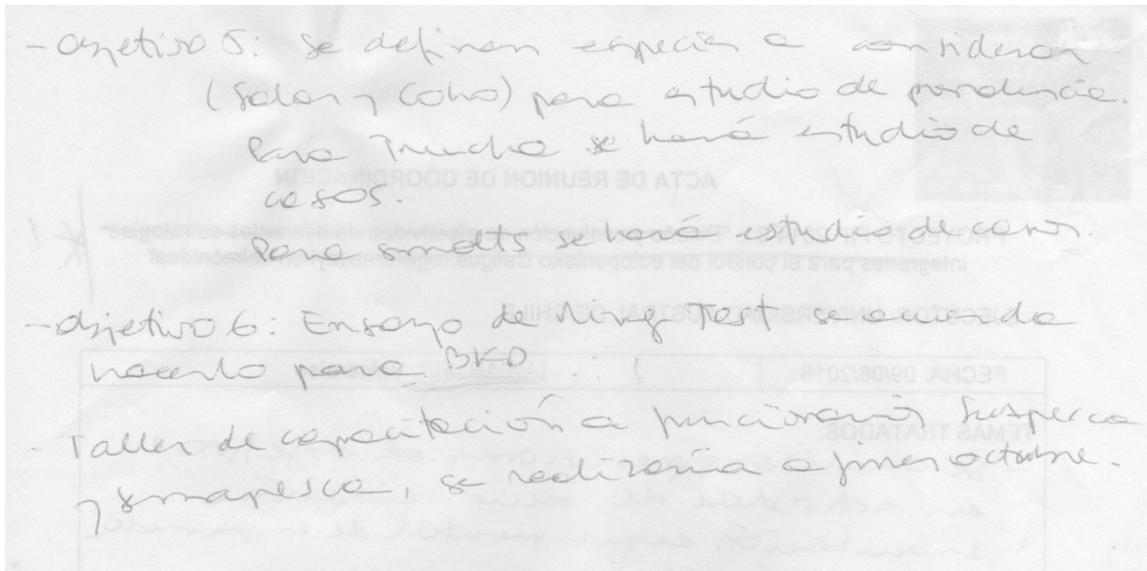
ACTA DE REUNION DE COORDINACION

PROYECTO FIP 2014-61: "Diseño y evaluación de efectividad de diferentes estrategias integradas para el control del ectoparásito *Caligus rogerresseyi* en salmónidos" /K!

EJECUTOR: UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FECHA: 09/06/2015	LUGAR: FIP, Valparaíso																					
<b>TEMAS TRATADOS:</b> - Se analizaron precisiones al objetivo 1 en actividad de secuenciación e inoculación experimental de empredes de rindónicos. - objetivo 2: Sinopsis entregará centros de reproductores para determinar día de muestreo y período de aplicación. En estudio epidemiológico de PRW en smolt, el contacto ya cuenta con información previa, por lo que respondería hacer estudio adicional de aislamientos. - objetivo 4: El mero necesario para validación de IFAT no se está produciendo, por lo que se evaluará la factibilidad de realizarlo, con consulta a Sinopsis y Sinopsis.																						
<b>ASISTENTES</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nombre</th> <th>Institución</th> <th>Firma</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mareen Alayaga G.</td> <td>Subpesca</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Daniela Peña</td> <td>Compelec</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Carla Argente</td> <td>Subpesca</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Miguel Ángel Eufraz</td> <td>UACH</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Alejandro Domitris</td> <td>Subpesca</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Mauricio Zamora</td> <td>FIP</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Nombre	Institución	Firma	Mareen Alayaga G.	Subpesca		Daniela Peña	Compelec		Carla Argente	Subpesca		Miguel Ángel Eufraz	UACH		Alejandro Domitris	Subpesca		Mauricio Zamora	FIP	
Nombre	Institución	Firma																				
Mareen Alayaga G.	Subpesca																					
Daniela Peña	Compelec																					
Carla Argente	Subpesca																					
Miguel Ángel Eufraz	UACH																					
Alejandro Domitris	Subpesca																					
Mauricio Zamora	FIP																					

Wpe →



## Acta Segunda Reunión de Coordinación Proyecto FIPA 2014-61

FECHA: 13 de enero 2016      LUGAR: FIPA, Valparaíso

LISTADO DE PARTICIPANTES: Se adjunta al final.

### TEMAS TRATADOS:

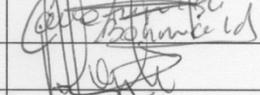
- Las observaciones del 1er Informe de Avance no se analizaron puesto que no se han recibido las opiniones del Evaluador Externo.
- En un breve análisis de los principales resultados por el representante del ejecutor, se destaca la confirmación de caso de HSMI de muestras de peces tomadas en presencia de inspectores de SERNAPESCA, lo que constituye el primer caso oficial de HSMI en el país. Corresponde a actividades relacionadas con el objetivo 1 del proyecto. En relación con el objetivo 2, destaca la presencia de Calicivirus en co-infección con PRV en salmónes del Atlántico sanos. Situación análoga a lo que ocurre en Noruega. Al respecto, la hipótesis inicial de que la co-infección supone una sinergia entre ambos virus, los resultados preliminares sugieren que pudiera ser antagónica, esto porque los valores de CT son mayores en la co-infección, y menores en peces positivos a la presencia de uno solo de los virus.
- Se informa la incorporación de un estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias UACH, cuya tesis analizará los resultados de la co-infección de PRV y Calicivirus, y su relación con algunos parámetros de respuesta inmune.
- Se detecta PRV en muestras de peces salmónidos silvestres de las 3 especies (s. Atlántico, s. coho y trucha arcoiris), de muestras recibidas como parte del objetivo 1. No se detecta HSMI en estas muestras.

- Con respecto al objetivo 3, implementar hibridación in situ de PRV, se discuten las posibilidades reales de su utilización de rutina. Se indica que es necesario tener un equipo especial para realizar los cortes de tejido, criótomo de congelación, ya que de muestras fijadas en parafina, no es posible pesquisar el virus por la labilidad del RNA. El ejecutor no posee este equipo, como tampoco el financiamiento necesario para comprarlo. Adicionalmente, los Laboratorios de la Red de SERNAPESCA no lo poseen. En consecuencia, la aplicabilidad de esta técnica, no es relevante para el diagnóstico de la enfermedad en el país. Como 3ª técnica de diagnóstico se tiene implementada la IHQ-PRV. Se compensará con un estudio de prevalencia de ASCV (Atlantic Salmon Calicivirus).
- Para la temporada de reproducción 2016, se tiene programado el chequeo de reproductores de s. Atlántico para determinar la prevalencia de PRV y de s. coho la prevalencia de BKD (Objetivo 2 y 5). Al respecto es necesaria la información de las pisciculturas activas y lotes de reproductores de estas especies, para diseñar el plan de muestreo. Esta información será enviada por SERNAPESCA durante el mes de marzo 2016 al ejecutor.
- Respecto del objetivo 4, de la revisión de las técnicas en uso para el diagnóstico de BKD, se implementó una encuesta muy simple para enviar a los Labs de la Red. Esta encuesta será enviada por SERNAPESCA a los Labs durante el mes de marzo 2016. Con esta información se evaluarán las técnicas más usadas por los Labs de la Red.
- Después de un intercambio de opiniones y dado los casos de HSMI asociados a mortalidad en fase marina de s. Atlántico, se realizará un ring test (Objetivo 6). El ring test a realizar (BKD o PRV) quedará sujeto a evaluación técnica por parte de Sernapesca, definiéndose en la próxima reunión.
- El curso programado “Enfermedades exóticas, emergentes y sindrómicas de importancia en acuicultura” se realizará durante la 2ª quincena de abril, considerando un cupo de 50 personas en la parte teórica y 20 en la parte práctica. Por esto debe ser realizado en el Campus de la Universidad Austral de Chile en Valdivia.
- Finalmente se analiza la posibilidad de posponer el preinforme final que tiene fecha 15.08.16, dada la necesidad de analizar los resultados del chequeo sanitario de los reproductores hasta agosto. Dependiendo de estos resultados será necesario enviar solicitud mediante carta de aplazamiento.

**Segunda Reunión de Coordinación Proyecto FIPA 2014-61**  
**“Estudio en epidemiología y técnicas de diagnóstico para**  
**enfermedades exóticas o emergentes con énfasis en *Piscine reovirus***  
**(PRV) y *Renibacterium salmoninarum* (BKD)”**

**13 Enero de 2016**

**LISTA DE ASISTENCIA**

Nº	Nombre	Institución	Firma
1	Ricardo Enríquez	Universidad Austral de Chile	
2	Carla Anguita	Sernapesca	
3	Alvaro Gaete	Sernapesca	
4	Alejandro Barrientos	Subpesca	
5	Maureen Alcayaga	Subpesca	
6	Michel Dapremontt	FIPA	

**Acta Tercera Reunión de Coordinación Proyecto FIPA 2014-61**

FECHA: 24 de abril 2017      LUGAR: FIPA, Valparaíso

LISTADO DE PARTICIPANTES: Maureen Alcayaga, Malú Zavando, Carla Anguita, Ricardo Enriquez

**TEMAS TRATADOS:**

Referidos a la entrega del Pre-informe final, al respecto se explica que debe contener todos los objetivos realizados y sus actividades. Al respecto, falta la ejecución del ring Test-BKD ya organizado y coordinado con SERNAPESCA, para aplicar durante la primera semana de julio y el taller de Difusión de Resultados programado para el 20 de julio, 2017, en el Hotel Solace de Puerto Varas. Se comunica que fue necesario incorporar a la Dra. Isabel Aguirre para la organización, elaboración y aplicación del Ring Test por la premura de entregar el pre-informe final.

## **Anexo 2: Programa de capacitación de profesionales perteneciente a la Autoridad sectorial en enfermedades emergentes, sindrómicas y exóticas.**

Se realizaron 2 actividades: el primer curso fue realizado en el Lab de Biotecnología y Patología Acuática en septiembre de 2015 de carácter teórico-práctico: "Cultivo celular, fundamentos teóricos y aplicaciones prácticas". Con el requisito de Médico veterinario, profesional del área biológica. Tuvo una duración total de 12,5 horas. Nº alumnos: 7 funcionari@s de Sernapesca. La certificación fue otorgada por la Universidad Austral de Chile. Requisitos: 85% de asistencia. Se requiere conocimiento acabado de las Normas Técnicas Nº 1, 2 y 3 de SERNAPESCA.

### **Programa del Curso**

**Jueves 10 de septiembre** (Sala de Reuniones Lab. Biotecnología y Patología Acuática, entrada Fundo Teja Norte s/n, Valdivia).

14:30 – 14:45 Recepción e inscripción. Objetivos del curso.

14:45 – 15:15 Introducción, Uso de cultivos celulares en peces, líneas celulares y cultivos primarios. Origen y certificación.

15:15 – 16:15 Toma de muestras para aislamiento viral y PCR. Órganos, diluciones, pool.

16:15 – 16:45 Café - Té

16:45 – 17:15 Manejo de las líneas celulares, mantención, controles, pasajes.

17:15 – 17:45 Preparación de líneas celulares para diagnóstico e investigación, placas, medios de cultivo, suero fetal, neutralización, esterilidad.

17:45 – 18:30 Infección de cultivos celulares, filtración, adsorción, CPE, seroneutralización, titulación.

**Viernes 11 de septiembre** (Sala de Reuniones Lab. Biotecnología y Patología Acuática, entrada Fundo Teja Norte s/n, Valdivia).

09:00 – 10:30 Sesión práctica, Toma de muestras y procesamiento. Envío de muestras.

10:30 – 11:00 Café - Té

11:00 – 13:00 Sesión práctica, Infección de líneas celulares, CPE. Confirmación.

14:30 – 15:30 Diagnóstico de virus prevalentes, IPNV, ISAV, PRV, exóticos.

15:30 – 16:00 Café - Té

16:00 – 17:00 Análisis Normas Técnicas de SERNAPESCA.

17:00 – 18:00 Discusión, mesa redonda.

18:00 - 19:00 Evaluación y certificación.

El segundo curso fue realizado el 18 de octubre 2016, en Hotel Vicente Costanera de Puerto Montt. Asistieron 22 funcionarios de SERNAPESCA regionales y de la Dirección Nacional. El Programa del curso "Enfermedades exóticas y emergentes de salmonídeos" y los temas tratados se detallan a continuación. Se realizó en 8 horas lectivas con evaluación final, todos los participantes aprobaron el curso.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

**Programa**  
**Curso Actualización Salud Animal SERNAPESCA**

**Curso: "Enfermedades Exóticas y Emergentes de Salmonídeos"**

Requisito: Médico veterinario  
Duración: Total 8 horas  
Nº alumnos: 22  
Certificación: La certificación del curso será realizada por la Universidad Austral de Chile.  
Requisitos: 85% de asistencia. Se requiere conocimiento acabado de las Normas Técnicas N° 1, 2 y 3 de SERNAPESCA.

**Programa del Curso**

**Martes 18 de Octubre** (Salón Reloncaví – Gran Hotel Vicente Costanera, Puerto Montt)

09:30 – 09:45 Recepción e inscripción  
09:45 – 10:45 Introducción, Enfermedades en acuicultura, proceso salud-enfermedad  
10:45 – 11:00 Café  
11:00 – 12:30 Enfermedades emergentes: (Amebiasis AGD, Red mark syndrome CWSD, Francisellosis, *Listonella anguillarum*)  
12:30 – 13:00 Discusión  
13:00 – 14:30 Almuerzo  
14:30 – 15:30 Enfermedades cardíacas de salmonídeos: (HSMI, CMS)  
15:30 – 16:30 Enfermedades exóticas: (PD/SD, EHN, OMV)  
16:30 – 16:45 Café  
16:45 – 17:45 Enfermedades exóticas: (VHS, IHN)  
17:45 – 18:00 Discusión  
18:00 – 18:30 Evaluación escrita

Profesor responsable: Dr. Ricardo Enríquez Sais, MV, Dr. med. vet.



Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile

---

Biotecnología y Patología Acuática - Entrada Fundo Teja Norte - Campus Isla Teja - Valdivia - Chile  
Casilla 567 - Fono: 56 63 221452 - Fax: 56 63 221510 - email: secpatan@uach.cl - www.uach.cl

Anexo 3: Taller de divulgación de Resultados



INSCRIPCIÓN TALLER DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

PROYECTO FIP2014-61 Estudio en epidemiología y técnicas de diagnóstico para enfermedades exóticas o emergentes con énfasis en Piscine reovirus (PRV) y Renibacterium salmoninarum (BKD)

HOTEL SOLACE, PUERTO VARAS, 20 DE JULIO 2017

NOMBRE	INSTITUCIÓN	MAIL	FIRMA
RUBÉN ORTIZ	COOKE CHILE	ruben.ortiz@cooke.com	[Firma]
Daniel Quiroz SERGIO CONTRERAS	COOKE CHILE IFOP	daniel.quiroz@cooke.com sergio.contras@ifop.cl	[Firma]
CRISTIAN ORTIZ Alexis Martínez	FISH VET GROUP ALAB	cristian.ortiz@fishvetgroup.com alexis.martinez@alab.cl	[Firma]
Emilio Carcamo	IASA	ecarcamo@iasa.cl	[Firma]
CARLOS LOBOS B.	HENDRIX GENETICS	carlos.lobos@hendrix-genetics.com	[Firma]
Paola Olmos	IFOP	paola.olmos@ifop.cl	[Firma]
MALVINO CRISTIAN	VENISQUANS	mcristi@venisquans.cl	[Firma]
VANESSA GONZALEZ	IFOP	vanessag@ifop.cl	[Firma]
Valeria Rojas	Internel	valeria@internel.cl	[Firma]
Valeria Rojas	Southern	valeria@southern.cl	[Firma]
Carla Jara	Southern	carla@southern.cl	[Firma]
Ashoum Uribe	CERNA	ashoum.uribe@cerma.com	[Firma]
GERARDO MUÑOZ P.	SEALAND	gerardo.muñoz@sealand.cl	[Firma]
Francisca Mardik	ADL	franciska@adl.com	[Firma]
Patricia Proschke	Diagnotec	patricia.proschke@diagnotec.cl	[Firma]
Roberto Reyes J.	COOKE CH	roberto.reyes@cooke.com	[Firma]
Rafaelo Quins	Southern	rafael@southern.cl	[Firma]
OSWALDO SANCHEZ	Southern	oswaldo@southern.cl	[Firma]
Ivonne Muñoz Varas	ALAB	ivonne.munoz@alab.cl	[Firma]
Herry Bohle	ADL	hbohle@adl.com	[Firma]
Carolina Senn R.	PATHO VET	carolina.senn@pathovet.cl	[Firma]
RICARDO ILDEFONSO C.	PATHO VET	ricardo.ildefonso@pathovet.cl	[Firma]



INSCRIPCIÓN TALLER DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

PROYECTO FIP2014-61 Estudio en epidemiología y técnicas de diagnóstico para enfermedades exóticas o emergentes con énfasis en Piscine reovirus (PRV) y Renibacterium salmoninarum (BKD)

HOTEL SOLACE, PUERTO VARAS, 20 DE JULIO 2017

NOMBRE	INSTITUCIÓN	MAIL	FIRMA
Emilia Jara A.	Escuela	Emilia.Jara@escuela.cl	[Firma]
ELENA CONTRAS	FVET	e.eleas.contras@fishnet.cl	[Firma]
Cristina Kuroda	Interpública	CKKURODA@interpub.com	[Firma]
Sonia Stoltz	BAH	Sonia.stoltz@bmkahh.health	[Firma]
TERNAKO BUSTAMANTE	ADL	ternanako@adl-diagnostica.cl	[Firma]
José González-Lore	Aquicola Alta	josel.gonzalez@aquicolaalta.cl	[Firma]
Tania Salas A.	Aquicola Alta	tsalas@aquicolaalta.cl	[Firma]
Antonio Lister	AO	ALISTERO@AO-DIAGNOSTICA.cl	[Firma]
Javier Pizarro	UACh	jpizarro@ua.cl	[Firma]
Rodrigo Torres H.	Fish Vet Group	rodrigo.torres@fishvetgroup.com	[Firma]
IVONNE HANO	Senwepesco	ihano@senwepesco.cl	[Firma]
Camila Leiva	Aquagestión	camila.leiva@assota.com	[Firma]
Francisco Vallejos	Blumar	francisco.vallejos@blumar.com	[Firma]
Diego Hidalgo	Comandancia	dhidalgo@comandancia.cl	[Firma]
Camila San Martín	Maine Harvest	Camila.sanmartin@maineharvest.com	[Firma]
Diego Bravo A.	Aquicultura	Diego.Bravo@aquicultura.cl	[Firma]
Rodrigo Palma	Fish Vet Group	Rodrigo.palma@fishvetgroup.com	[Firma]
Karen Ruiz	MH Harvest	Karen.ruiz@maineharvest.com	[Firma]
Fraida González G.	Invenmar	fraida.gonzalez@invenmar.cl	[Firma]
Uriana Alder	Aquicultura	Uriana@aquicultura.cl	[Firma]
Fernando Barrera	Verispecies	fernando@verispecies.cl	[Firma]

## **Anexo 4: Curriculum Vitae**

Augusto Vargas González  
Bioquímico  
Contador General

### Extracto

Soy Bioquímico titulado de la Universidad Austral de Chile. He gestionado pequeños laboratorios de biología molecular y microbiología. He trabajado en inocuidad alimentaria en la detección de patógenos de importancia en salud humana y he participado en proyectos de investigación de patógenos en el área de salud animal en acuicultura. He participado en la implementación de un laboratorio de biología molecular, diseñando sus espacios, realizando las cotizaciones de los equipos necesarios, supervisando y también realizando personalmente la instalación de éstos cuando fue necesario y capacitando al personal para el uso de los mismos, todo con éxito. Implementé un método de conteo en placa de probióticos en muestras de alimento para peces según la norma francesa. He realizado ensayos de evaluación de medios de cultivo para diferentes especies bacterianas y guiado y supervisado estudiantes en práctica profesional.

### Datos personales

Fecha de Nacimiento: 25 de Abril de 1982  
Edad: 34 años  
C.I.: 15.284.786-6  
Nacionalidad: Chileno  
Estado Civil: Soltero  
Dirección Particular: Las Mulatas 360, casa N°60, Valdivia  
Fono: 9-82633797  
E-mail: [augusto.vargas.ceo@gmail.com](mailto:augusto.vargas.ceo@gmail.com)

### Experiencia profesional

#### Laboratorios

Noviembre 2015 – Enero 2016. Asistente técnico de investigación en el Laboratorio de biotecnología e inmunología acuática de la Universidad Austral de Chile. Fondo Semilla UAEM-UACH

Octubre 2014 – Mayo 2015. Analista en el laboratorio de biología molecular de inocuidad alimentaria en Aquagestión S.A. Puerto Montt. Asesor y colaborador del laboratorio de microbiología de inocuidad alimentaria. Encargado de laboratorio de biología molecular de inocuidad alimentaria (etapa final)

Enero 2014 – Julio 2014. Asistente técnico de investigación del laboratorio de biotecnología e inmunología acuática de la Universidad Austral de Chile. Proyecto FONDAP 15110027 “Interdisciplinary Center for Aquaculture research (INCAR).”

Enero - Febrero 2013. Asistente de investigación en el departamento de I+D de la empresa Aquagestión S.A. Puerto Montt en el marco de práctica profesional.

#### Formación Académica

## Título Profesional

Bioquímico, Licenciado en Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, año 2014

## Título Técnico

Contador General, Liceo Comercial Puerto Montt, Puerto Montt, año 2001.

## Cursos

Muestreador Oficial de Productos Pesqueros de Exportación, Servicio Nacional de Pesca, abril 2015, aprobado

Evaluación Sensorial de los Alimentos, Aquagestión Capacitación S.A., noviembre 2014, aprobado

Bioinformatics Workshop "Hands on", Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, diciembre 2013, aprobado

## Idiomas

Español: nativo

Inglés: nivel técnico hablado y escrito

## Habilidades profesionales

- PCR convencional y PCR tiempo real y detección de patógenos usando estas técnicas.
- Siembra de bacterias en medio sólido y líquido (placas petri con agar y en tubos con caldos respectivamente) bajo campana y/o mecheros.
- Almacenamiento de cepas de *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* en crioviales.
- Clonamiento bacteriano de fragmentos de ADN.
- Inmunohistoquímica
- Tinción de Gram y otras.
- Preparación de medios líquidos y sólidos para cultivo bacteriano.
- Preparación de reactivos y soluciones varias de uso en química y biología.
- Análisis filogenético en base a secuencias de 16S rRNA e ITS-1 bacterianas.
- Serotipificación de *L. monocytogenes* en base a secuencias MLST (ver Instituto Pasteur).

Manejo los programas:

Excel, Power Point, Microsoft Word, MEGA 5.1, Clustal W, Image J y Geneius 7.1.3 (éstos dos últimos parcialmente).

## Presentaciones en congresos científicos

“Genotipificación de *Piscirickettsia salmonis* desde muestras de peces silvestres del sur de Chile, estudio del operón ribosomal”. 2014. **Vargas A.**, S. Contreras, P. Olmos, J. Figueroa, R. Enríquez y A. Romero. XXXIV Congreso de Ciencias del Mar. Universidad de Los Lagos, Osorno, Chile. Como expositor oral

“Estudio de la presencia de *Piscirickettsia salmonis* en peces silvestres del sur de Chile. Identificación y análisis del gen ribosomal 16S”. 2012. **Vargas A.**, Cordero F.A., Miranda P., Encina C., Vásquez J., Enríquez R. y Romero A. XVII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria, Valdivia, Chile. Como expositor oral

#### Publicaciones

Identification and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* in native fish from southern Chile. Author(s): Contreras-Lynch S., Olmos P., **Vargas A.**, Figueroa J., González-Stegmaier R., Enríquez R., Romero A. *Dis Aqua Org* 155: 233–244, 2015

First identification of *Francisella noatunensis subsp. orientalis* causing mortality in Mexican tilapia (*Oreochromis spp*). Author(s): Ortega C., Mancera G., Enríquez R., **Vargas A.**, Martínez S., Fajardo R., Navarrete M.J., Romero A. *Dis Aqua Org* 120:205-215, 2016.

Valdivia, Marzo de 2016

#### INFORMACIÓN PERSONAL:

Nombre: **Isabel Margarita Aguirre Gil**. Cédula de identidad: 13.257.484-7 Lugar y fecha de nacimiento: Santiago de Chile, 25 de Octubre de 1977. Nacionalidad: Chilena. Dirección particular: General Lagos 1090, depto B1, Valdivia. Móvil: 981373253 Correo electrónico: iaguirregil@gmail.com

#### ESTUDIOS REALIZADOS:

Universidad de Chile. Campus Sur. Grado académico: Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Fecha obtención grado: Agosto 2009. Fecha de inicio del programa: Marzo de 2004. Título de la tesis: “Caracterización genotípica de Pestivirus aislados de camélidos sudamericanos en Chile”.

Universidad de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Título: Médico Veterinario. Grado académico: Licenciado en Medicina Veterinaria. Fecha de Inicio de la carrera: Marzo 1995. Fecha de término de la carrera: Noviembre 2002. Título de la memoria: “Respuesta hematológica y de enzimas musculares al proceso de esquila en guanacos (*Lama guanicoe*) mantenidos en cautiverio”.

#### CRONOLOGÍA LABORAL:

Noviembre 2015 a Marzo 2017. Labor realizada: Investigación. Cargo desempeñado: Postdoctoral Research Associate Lugar: Department of Population Health, College of Veterinary Medicine. University of Georgia. Marzo 2012 a marzo de 2014. Labor realizada: Docencia, Escuela de Medicina Veterinaria. Cargo desempeñado: Académico por horas Lugar: Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias. Universidad Mayor.

Octubre de 2012 a la fecha. Labor realizada: Docencia en Instituto de Bioquímica y Microbiología. Cargo desempeñado: Académico a honorarios. Lugar: Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

Marzo 2009 a Marzo de 2012. Labor realizada: Docencia, investigación y diagnóstico viral Instituto de Bioquímica y Microbiología. Cargo desempeñado: Académico (Profesor Auxiliar) jornada completa. Lugar: Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

Junio 2011. Labor realizada: Actualización de enfermedades infecciosas virales en ganado bovino para el Servicio Agrícola y Ganadero, Región de Aysén y productores de ganado bovino de la Región de Aysén. Cargo desempeñado: Asesoría externa. Lugar: Servicio Agrícola y Ganadero. Región de Aysén.

Marzo - Enero 2009. Labor realizada: Servicio de Diagnóstico en Patología Clínica Veterinaria. Cargo desempeñado: Profesional a cargo. Lugar: Laboratorio de Hematología y Bioquímica clínica. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

Marzo 2006 - Marzo 2008. Labor realizada: Coordinación de actividades prácticas del ramo Hematología y bioquímica clínica. Cargo desempeñado: Académico. Lugar: Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

#### ACTIVIDADES ACADÉMICAS:

##### Docencia:

Marzo 2009 a la fecha: Docencia Pre-grado para la Facultad de Ciencias y Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Marzo 2012 a marzo de 2014: Docencia Pre-grado para la Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias, Universidad Mayor.

Marzo 2009 a marzo de 2012: Docencia Post-grado para las facultades de Ciencias y Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Marzo 2006 - Diciembre 2008: Docencia Pre-grado. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

##### Investigación:

Entidad: Facultad de Ciencias y Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Calidad de participación: Investigador responsable. Fuente de financiamiento: Proyecto DID N° S-2011-02, Universidad Austral de Chile. Título del proyecto: "Identificación y genotipificación de Pestivirus pesquisados desde rebaños ovinos pertenecientes a la Región de Los Ríos". Fecha de inicio: Mayo 2011. Fecha de término: Diciembre 2012.

Entidad: Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Calidad de participación: Co-investigador. Fuente de financiamiento: Proyecto Fondecyt N° 1101020. Título del proyecto: "Herd prevalence and validation of diagnostic tests for three important infectious diseases in dairy herds from Southern Chile". Fecha de inicio: Junio 2010. Fecha de término: Marzo 2013.

Entidad: Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Calidad de participación: Co-investigador. Fuente de financiamiento: Proyecto Fondecyt N° 1080130. Título del proyecto: "Análisis genómico, antigénico y de virulencia de pestivirus obtenidos de rumiantes domésticos". Fecha de inicio: Marzo de 2008. Fecha de término: Marzo de 2009.

#### DIFUSIÓN Y COMUNICACIONES:

I.M Aguirre, R Fuentes y M.O. Celedón. "Genotypic characterization of Chilean llama (*Lama glama*) and alpaca (*Vicugna pacos*) Pestivirus isolates". *Veterinary Microbiology* 168:312-317.2014.

I.M Aguirre, M.P Quezada y M.O. Celedón. "Antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from alpaca (*Vicugna pacos*), llama (*Lama glama*) and bovines in Chile. *Veterinary Microbiology* 168:324-330.2014.

Sergio A Arancibia, Caroll J Beltrán, Isabel M Aguirre, Paulina Silva, Alexis L Peralta, Frano Malinarich y Marcela A Hermoso. "Toll-like receptors are key participants in innate immune responses". *Biological Research* 40:97-112. 2007.

"Asociación entre indicadores del balance metabólico de algunos micronutrientes e infecciones virales en vacas de pequeños productores lecheros". Chihuailaf R., Acosta G., Mónica Pradenas, Aguirre I., Salgado M., Soto J. XXXVI Congreso anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal, Punta Arenas, Chile, 9-11 noviembre, 2011.

"Genotipificación de Pestivirus obtenidos de rebaños ovinos de la Región de los Ríos". Aguirre I., Oyarzún R., Cordero F., Chihuailaf R. X Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, Argentina, 26-29 Septiembre, 2011.

"Genotipificación de Pestivirus aislados de llamas (*Lama glama*) y alpacas (*Lama pacos*) en Chile". Aguirre G., Isabel M. y Celedón V., María O. VI Congreso Nacional De Virología, Merida, Yucatán, México, 15-19 Noviembre, 2009.

#### ANTECEDENTES ADICIONALES:

Evaluación de proyectos: Concurso FONDECYT Iniciación en investigación 2013.

Arbitrajes de trabajos solicitados para: Publicación en *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.

Publicación en Revista Archivos en Medicina Veterinaria.

Presentación en XXVI World Buiatrics Congress, 2010. Santiago, Chile, 14-18 noviembre.

Otros idiomas: Inglés oral y escrito nivel intermedio avanzado - IELTS: 6.5 (Julio 2015)

Técnicas de laboratorio: Cultivo celular: - Preparación de medios - Propagación de células - Producción de cultivos primarios

Aislamiento viral: - Preparación de inóculos - Titulación viral - Identificación por inmunofluorescencia - Identificación por Inmunoperoxisada - Diferenciación de efectos citopáticos virales en cultivo (Virus respiratorios bovinos y Virus Influenza)

Biología molecular: - Extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de diferentes tipos de muestras biológicas (Suero, sangre, leche, heces) - Amplificación de genes blanco a través de PCR, RT-PCR y real time RT-PCR - Clonación en sistemas bacterianos

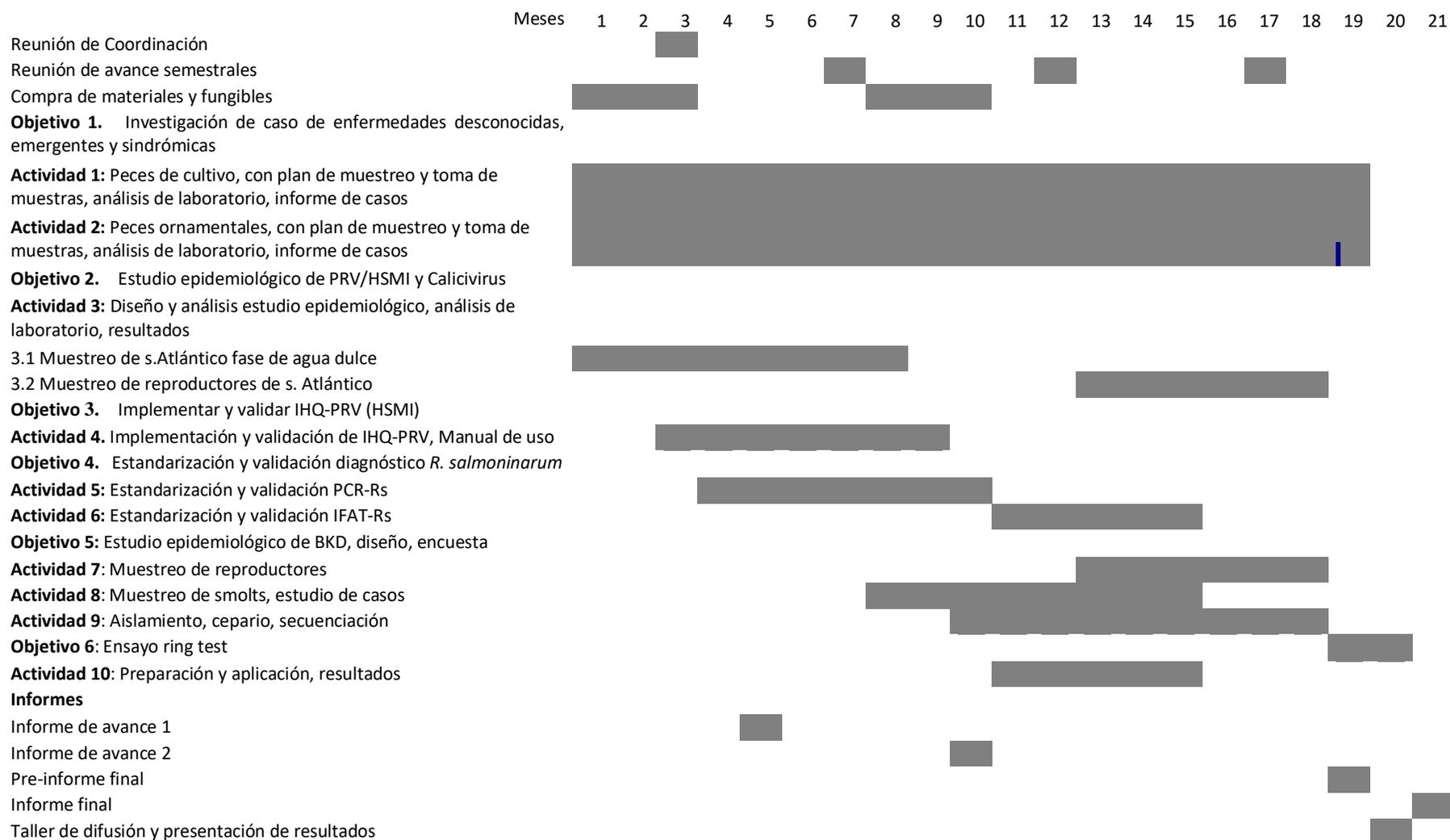
- Visualización de amplificados en geles de agarosa

Serología: - Seroneutralización - Titulación de anticuerpos antígeno-específicos

Técnicas Bioinformáticas:

- Análisis de secuencias virales obtenidas con bases de datos - Obtención de secuencias de partidores para identificación de genes virales - Alineamiento múltiple de secuencias de genes virales - Determinación de cercanía filogenética entre secuencias de aislados - Análisis filogenético de secuencias virales

## Anexo 5: Plan de trabajo



## Anexo 6: Centro Capera y seguimiento

### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Marcela Lara / Oficina Nacional Servicio Nacional de Pesca

Nº Caso		25/15 PRE INFORME V00	
Fecha recepción de las muestras		15.09.15	Fecha emisión del informe 16 .10.2015
Empresa		SERVICIO NACIONAL DE PESCA	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Centro Capera	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		Sin información	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No aplica	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		Examen virológico, PCR-PRV, Histología	
Tipo de muestra		Muestras de órganos en: RNA later- medio mantención virología-muestras de sangre+Edta, muestras histología.	Especie <i>S. salar</i>
Condición de la muestra		Sin información	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	15 Peces 5 tubos con órganos: corazón, riñón, bazo para cultivo celular. 15 tubos con órganos: corazón, riñón, bazo en RNA LATER 15 tubos con órganos: branquias, corazón, riñón, bazo, músculo para histología +1 tubo control 15 tubos muestras de sangre + EDTA
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Ricardo Enríquez , Osvaldo Sandoval funcionario Sernapesca Puerto Montt	
Fecha del muestreo	15.09.15	Tipo de muestreo (si aplica)	Muestreo dirigido
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			

**RESULTADOS DE ENSAYOS**

<b>BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)</b>						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 25/15	RT PCR PRV (L1)	1	Individual	Ri, Ba,Co (*)	24,9	Positivo
		2	Individual	Ri, Ba,Co (*)	25,1	Positivo
		3	Individual	Ri, Ba,Co (*)	25,7	Positivo
		4	Individual	Ri, Ba,Co (*)	24,1	Positivo
		5	Individual	Ri, Ba,Co (*)	26,5	Positivo
		6	Individual	Ri, Ba,Co (*)	26,9	Positivo
		7	Individual	Ri, Ba,Co (*)	26,7	Positivo
		8	Individual	Ri, Ba,Co (*)	24,2	Positivo
		9	Individual	Ri, Ba,Co (*)	24,7	Positivo
		10	Individual	Ri, Ba,Co (*)	24,4	Positivo
		11	Individual	Ri, Ba,Co (*)	26,8	Positivo
		12	Individual	Ri, Ba,Co (*)	24,3	Positivo
		13	Individual	Ri, Ba,Co (*)	25,1	Positivo
		14	Individual	Ri, Ba,Co (*)	25,6	Positivo
		15	Individual	Ri, Ba,Co (*)	24,8	Positivo

Fecha de inicio ensayos: 06/10/15 Fecha término ensayos: 13/10/15

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**  
 RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.  
**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
 Nivel de incertidumbre asociada: No aplica  
**OBSERVACIONES:**  
 \*Riñón (Ri), Bazo (Ba) y Corazón (Co).  
 El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)  
 ELF: Rango de CT 21,7-23,9



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Todos los peces de la muestra, incluido el aparentemente sano obtenido al azar, son positivos a PRV mediante RT PCR. El examen histológico revela lesiones características de HSMI en todos los peces muestreados, por lo que se confirma caso de HSMI. Los intentos de aislamiento de PRV no han resultado al tercer pasaje en CHSE-214 y EPC. El hemograma realizado indica principalmente anemia y disminución del VCM.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 16 de Octubre de 2015.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

---

CASOS PANI: 572-15-E a 586-15-E (CASO 25/15)

FECHA: 16 de septiembre de 2015

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

---

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

---

ESPECIE: *Salmo salar*

---

**ANAMNESIS:** Se reciben 15 tubos correspondientes al **Caso 25/15**, por parte del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. El tubo 1 corresponde a un pez control. Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón, músculo esquelético, riñón, bazo, branquias e hígado, fijados en formalina al 10%. Código de las muestras: 1 a 15. Corresponden a muestras sospechosas de HSMI, Proyecto FIP-2015.

### **DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

**Corazón:** Todas las muestras presentaron epicarditis mononuclear difusa, en grados leves a severo. Además, se observó en el miocardio de la mayoría de las muestras, un infiltrado mononuclear difuso, que abarcaba desde la capa compacta hasta la capa esponjosa, en grados leve a severo. En algunos casos se observaron también focos de fibras miocárdicas degeneradas en la capa esponjosa.

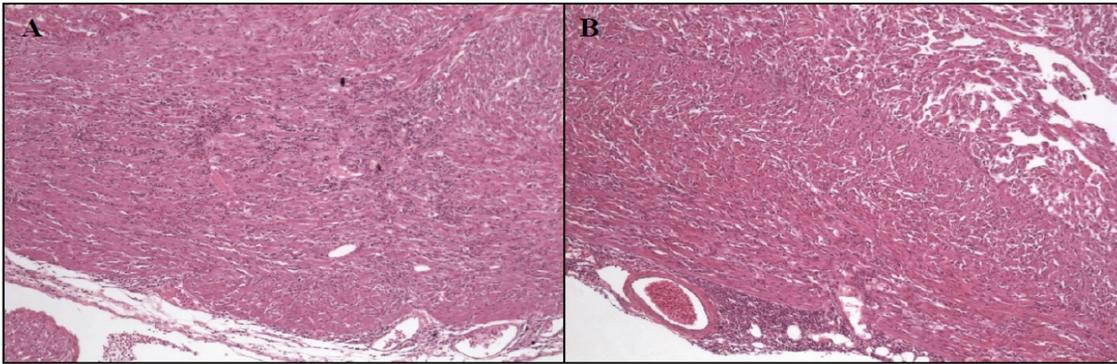
**Músculo esquelético:** En 14 de 15 muestras se presentó un infiltrado mononuclear leve a severo en el músculo rojo. En 6 de 15 muestras fue posible observar además el reemplazo de las fibras musculares por fibroblastos. No se observaron cambios en el músculo blanco.

**Hígado:** En 5 de 15 muestras se observaron zonas focales, periportales de degeneración y necrosis, con leve a moderada infiltración inflamatoria mononuclear.

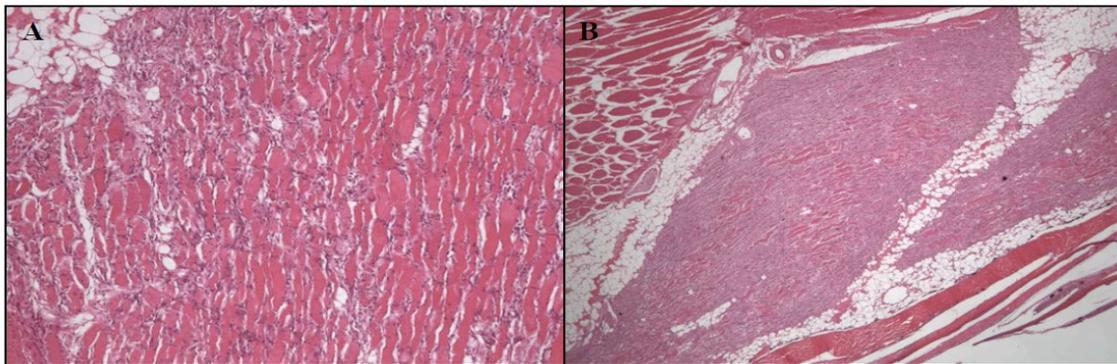
**Riñón:** La mayoría de las muestras presentan degeneración tubular en grado leve, acompañado de una leve infiltración mononuclear difusa en el intersticio.

**Bazo:** Todas las muestras presentaron depleción linfóide en grado leve a moderado.

**Branquias:** Todas las muestras presentaron hiperplasia epitelial en el ápex de las láminas primarias, con una leve fusión de laminillas secundarias.



**Figura 1:** (A) Caso 575-15-E. Epicarditis mononuclear difusa leve y miocarditis difusa moderada, afectando tanto la capa compacta como la esponjosa. 10X, HE. (B) Caso 577-15-E. Epicarditis mononuclear difusa severa y miocarditis difusa severa, afectando tanto la capa compacta como la esponjosa. 10X, HE.



**Figura 1:** (A) Caso 575-15-E. Miositis mononuclear difusa moderada, con moderada degeneración difusa de las fibras musculares. 40X, HE (B) Caso 577-15-E. Miositis mononuclear difusa severa, con severa degeneración difusa de las fibras musculares y reemplazo del tejido muscular por fibroblastos. 10X, HE.

**DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS:**

- Miositis mononuclear difusa, moderada a marcada.
- Epicarditis mononuclear difusa, moderada a severa.
- Panmiocarditis mononuclear difusa, moderada a severa.
- Degeneración y necrosis hepática periportal, multifocal, leve a moderada.
- Degeneración tubular renal, multifocal, leve.
- Nefritis intersticial difusa, leve.
- Depleción linfoide esplénica, difusa, leve.
- Hiperplasia epitelial branquial, focal en ápex, leve.

**CONCLUSIÓN:** Los hallazgos observados tanto en corazón como en músculo esquelético rojo corresponden principalmente a cambios inflamatorios con infiltración mononuclear, acompañados de degeneración de las fibras musculares y/o miocárdicas. Los cambios relacionados al reemplazo de las fibras musculares del músculo rojo por fibroblastos sugieren que este proceso inflamatorio ya ha evolucionado a un proceso de reparación, siendo éste un signo de cronicidad.

El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución corresponden a los hallazgos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI).



**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica  
Instituto de Patología Animal  
Universidad Austral de Chile



Lab.: 1565-15

EXAMEN HEMATOLÓGICO

Propietario: Biotecnología y Patología Rut:

Dirección: Mail:

Solicitante: Ricardo Enriquez

Especie: Peces Caso: 25115

Identif.	VGA	Hemoglobina	Eritrocitos	Leucocitos	Plaqa	VCM	CHCM	PROT	Hemólisis	Ictericidad
N°	%	(g/L)	(10 <sup>6</sup> /ul)	(ul)	(10 <sup>3</sup> /ul)	(fl)	(g/L)	(g/L)		
1	57	84	1,1	8700	5300	518	147	75	++	-
2	47	92	1,2	8600	6500	392	198	75	+	-
3	30	56	1	9100	2900	300	187	40	+	-
4	39	81	0,68	6900	4400	574	156	58	+	-
5	35	77	1,5	5900	1400	233	220	45	-	+
6	23	65	0,89	12700	2300	258	283	18	-	+
7	36	78	0,71	6900	1300	507	217	50	-	+
8	45	77	0,72	12700	2400	625	171	52	-	+
9	38	81	0,63	13400	1500	603	161	45	-	+
10	50	82	0,94	18000	2000	532	164	65	-	+
11	47	73	0,96	11900	3200	490	155	52	-	+
12	40	90	1,7	11830	2600	235	225	45	-	+
13	24	50	0,36	8600	2000	667	208	20	++	-
14	38	92	0,79	10940	1930	481	242	65	-	+
15	45	75	0,74	7400	1000	608	167	65	-	+

Formula diferencial

Identif.	Basofos		Heterofilos		Linfocitos		Monocitos		Observacion
	%	ul	%	ul	%	ul	%	ul	
1	0	0	10	870	87	7569	3	261	MA+,EP+
2	2	172	37	3182	51	4386	10	860	MA+,EP+
3	0	0	23	2093	61	5551	13	1183	MA+,EP+
4	0	0	13	897	60	4140	27	1863	MA+,EP+
5	0	0	32	1888	60	3540	8	472	MA+,EP+
6	0	0	28	3556	62	7874	10	1270	MA+,EP+
7	1	69	24	1656	50	3450	25	1725	MA+,EP+
8	1	127	13	1651	72	9144	14	1778	MA+,EP+,ICM+
9	0	0	7	938	27	3618	66	8944	MA+++,EP+,LR+,ICM++
10	0	0	14	2520	64	11520	22	3960	MA+,EP+,LR+
11	0	0	45	5355	47	5593	8	952	MA+,EP+,LR+
12	0	0	30	3540	63	7453	7	828,1	MA+,EP+,LR+
13	0	0	34	2924	46	3956	20	1720	MA+,EP+,LR+
14	0	0	12	1312,8	82	8971	6	656,4	MA+,EP+,LR+
15	0	0	26	1924	52	3848	22	1628	MA+++,EP+,LR++

ICM+ Inclusiones citoplasmáticas en los monocitos MA+ Monocitos activados

EP+ Eritrocitos policromáticos LR+ Linfocitos reactivos

++ Leve +++ Moderada ++++ Marcada.

Obs: Muestra N° 1 corresponde al control.

1- La hemólisis puede afectar el recuento de eritrocitos.

2- Todas las muestras presentan apoptosis celular de leve a moderada cantidad.

3- Las inclusiones observadas tienen estructuras compatibles con bacterias tipo cocos.

4- En la muestras N°9, se observan dos tipos de inclusiones, la primera tipo cocos y la segunda a pigmentos de color verde negro ¿Hemoglobina? ¿Melanina?

## INFORME DE CASO 02.16 (SEGUIMIENTO CASO 25.15)



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Marcela Lara, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIPA 2014- Seguimiento caso Positivo HSMI-Capera.

Nº Caso		02/16 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		19.01.16	Fecha emisión del informe 29.02.2016
Empresa		Servicio Nacional de Pesca	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Centro Capera	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		101295	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		Nº Guía de Despacho 412769	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		Histología y PCR , seguimiento caso Positivo HSMI	
Tipo de muestra		Muestras de órganos en: RNALater y formalina bufferizada al 10%	Especie <i>S. salar</i>
Condición de la muestra		Tº muestras:10ºC	
Jaulas muestreadas (si aplica)	214	Nº de muestras/ peces	9 tubos con órganos (corazón, riñón) en RNALater. 8 tubos con órganos (no se indica los órganos que componen el pool) en formalina al 10%.
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información		
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 02/16	RT PCR PRV (L1)	1	Individual	Corazón, Riñón	28,75	<b>Positivo</b>
		2	Individual	Corazón, Riñón	30,95	<b>Positivo</b>
		3	Individual	Corazón, Riñón	28,45	<b>Positivo</b>
		4	Individual	Corazón, Riñón	32,21	<b>Positivo</b>
		5	Individual	Corazón, Riñón	29,73	<b>Positivo</b>
		6	Individual	Corazón, Riñón	30,48	<b>Positivo</b>
		7	Individual	Corazón, Riñón	29,92	<b>Positivo</b>
		8	Individual	Corazón, Riñón	30,97	<b>Positivo</b>
		9	Individual	Corazón, Riñón	30,16	<b>Positivo</b>
Caso 02/16	RT PCR CLV ASCV Campo	1	Individual	Corazón, Riñón	No CT	Negativo
		2	Individual	Corazón, Riñón	31,00	<b>Positivo</b>
		3	Individual	Corazón, Riñón	No CT	Negativo
		4	Individual	Corazón, Riñón	No CT	Negativo
		5	Individual	Corazón, Riñón	26,67	<b>Positivo</b>
		6	Individual	Corazón, Riñón	No CT	Negativo
		7	Individual	Corazón, Riñón	No CT	Negativo
		8	Individual	Corazón, Riñón	No CT	Negativo
		9	Individual	Corazón, Riñón	No CT	Negativo

Fecha de inicio ensayos: 26/1/16 Fecha término ensayos: 3/2/16

METODOLOGÍA UTILIZADA:  
RT PCR Tiempo Real HSM1 Fragmento L1, Palacios 2010.  
RT PCR Tiempo Real Calicivirus, Mikalsen 2014.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:  
El Ct de corte para Fragmento L1 y CLV corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)  
ELF: Rango de CT 16,6 – 20,1



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



HISTOLOGÍA		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 02/16	Corazón – músculo	Individual
Fecha de inicio ensayos: 21.01.16 Hallazgos y conclusiones: Ver informe de Histología adjunto.		Fecha término ensayos: 25.01.16

**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

El tipo de lesiones histológicas presentes en estas muestras corresponden a los hallazgos encontrados en la enfermedad inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), sin embargo su magnitud es menor a la observada en las lesiones clásicas que se presentan frente a un cuadro clínico. En comparación al caso 25/15 (572-15-E a 586-15-E), analizado en septiembre de 2015, las muestras observadas en este análisis presentan una severidad menor, aun cuando siguen los valores de CT de RT PCR-PRV similares. También se detecta positividad 2/9 a Calicivirus.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAÍS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 29 de Febrero de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 24-16-E a 31-16-E (CASO 02/16)

FECHA ENVÍO: 21 de enero de 2016

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Salmón Atlántico (*Salmo salar*)

#### ANAMNESIS

Se reciben 8 tubos (rotulados 1 a 8) correspondientes al Caso 02/16, por parte del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón y músculo esquelético, fijados en formalina al 10%.

Corresponden a muestras de peces sobrevivientes a brote de HSMI, Proyecto FIP 2014-61.

Código de las muestras:

- Tubo 1: 24-16-E
- Tubo 2: 25-16-E
- Tubo 3: 26-16-E
- Tubo 4: 27-16-E
- Tubo 5: 28-16-E
- Tubo 6: 29-16-E
- Tubo 7: 30-16-E
- Tubo 8: 31-16-E

#### DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA

**Corazón:** Todas las muestras presentaron epicarditis mononuclear difusa, con grados de severidad que variaron de traza (células inflamatorias individuales y aisladas) a moderada (en grado moderado solo muestra tubo 5, 28-16-E). Además, se observó en el miocardio de todas las muestras, un infiltrado mononuclear difuso, que abarcaba desde la capa compacta hasta la capa esponjosa, en grados leve a moderado (en grado moderado solo muestra tubo 8, 30-16-E).

**Músculo esquelético:** En todas las muestras analizadas se presentó un infiltrado mononuclear focal y/o multifocal leve en el músculo rojo, sin observarse alteraciones patológicas en el músculo blanco. Además, en las zonas de inflamación fue posible observar el reemplazo leve de las fibras musculares por fibroblastos o tejido adiposo, especialmente en el margen entre el músculo blanco y rojo.

#### DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS

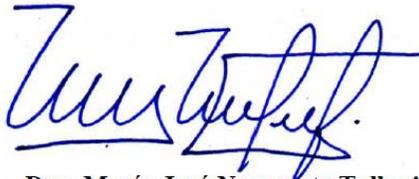
- Epicarditis mononuclear difusa, traza a moderada.
- Panmiocarditis mononuclear difusa, leve a moderada.
- Miositis mononuclear focal y/o multifocal con fibroblastos, leve.

### **CONCLUSIÓN**

Los hallazgos observados tanto en corazón como en músculo esquelético rojo corresponden principalmente a cambios inflamatorios con infiltración mononuclear, acompañados de degeneración de las fibras musculares. Los cambios relacionados al reemplazo de las fibras musculares del músculo rojo por fibroblastos sugieren que este proceso inflamatorio ya ha evolucionado a un proceso de reparación, siendo éste un signo de cronicidad.

El tipo de lesiones presentes en estas muestras corresponden a los hallazgos encontrados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), sin embargo su magnitud es menor a la observada en las lesiones clásicas que se presentan frente a un cuadro clínico.

En comparación al caso 25/15 (572-15-E a 586-15-E), analizado en septiembre de 2015, las muestras observadas en este análisis presentan una severidad menor. Los cambios patológicos presentes en el corazón son de menor magnitud y no se aprecia degeneración de miocardiocitos. Sin embargo en el músculo rojo, los hallazgos observados son el reflejo de un proceso reparativo y crónico.



**Dra. María José Navarrete Talloni**

**M.V., M.P.V.M., Ph.D.**

Laboratorio de Anatomía Patológica  
Instituto de Patología Animal  
Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 25.01.16.-

## Anexo 7: CASOS SOSPECHOSOS DE SIT (Truchas)



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Marcela Lara, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIP 2014-61 (Muestras SIT)

Nº Caso		33/15 INFORME FINAL V00		
Fecha recepción de las muestras		22.12.15	Fecha emisión del informe	27.01.16
Empresa		Servicio Nacional de Pesca		
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		Sin información		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	Formulario de envío de muestras a laboratorio de verificación sin número.
Exámenes solicitados		Histología		
Tipo de muestra		Muestras de órganos en formalina bufferizada al 10%	Especie	<i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra				
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información		Nº de muestras/ peces	1 con órganos (corazón, músculo, hígado, riñón) en formalina al 10% (código muestra DF86-1)
Grupo (si aplica)	Sin información		Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información		
Fecha del muestreo	15.12.15	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información	
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.				



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 33/15 Código muestras DF86-1	Pool de órganos	Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: 23.12.15 Hallazgos y conclusiones: Ver informe de examen histológico.		Fecha término ensayos: 21.01.16

**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Autólisis marcada a severa. Muestras mal tomadas.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 27 de Enero de 2015.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

---

CASOS PANI: 656-15-E (CASO 33/15)

FECHA ENVÍO: 23 de diciembre de 2015

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

---

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

---

ESPECIE: Trucha (*Oncorhynchus mykiss*)

---

**ANAMNESIS:** Se analizan muestras de corazón, riñón, hígado y músculo esquelético, correspondientes al Caso 33/15, enviadas en el marco del proyecto FIP 2014-61, desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.  
Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón, fijados en formalina al 10%.  
Rótulo del tubo: 111.  
Código de las muestras: DF 86-1.  
Se solicita verificar la calidad de la muestra.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA:**

**Corazón:** Autólisis marcada a severa. Leve epicarditis mononuclear, difusa.

**Hígado:** Autólisis leve. Los hepatocitos presentan vacuolas en su citoplasma, con desplazamiento del núcleo hacia el borde de la célula, concordante con esteatosis moderada. Atrofia de hepatocitos moderada.

**Músculo esquelético:** Autólisis moderada a marcada. No se observan alteraciones en músculo rojo ni blanco.

**Riñón:** Autólisis moderada a marcada. Leve aumento de la celularidad del glomérulo con disminución del espacio de Bowman. Leve aumento de células en el intersticio renal.

**CONCLUSIÓN:** La calidad de la muestra se vio disminuida debido a una fijación deficiente, la cual puede tener varias causas, siendo la principal el tamaño de la muestra y su relación con el fijador. Se debe considerar el uso de formalina al 10% en una razón de 1:3 con la muestra (es decir, la muestra en el tubo debe ser 1/3 del volumen total del contenido), donde la muestra no debe exceder un tamaño de 1,5-2 cm.

El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMD).



**Dra. Maria José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.  
Laboratorio de Anatomía Patológica  
Instituto de Patología Animal  
Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 21.01.16.-



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Marcela Lara, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIP 2014-61 (Muestras SIT)

Nº Caso		34/15 INFORME FINAL V00		
Fecha recepción de las muestras		29.12.15	Fecha emisión del informe	27.01.16
Empresa		Servicio Nacional de Pesca		
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		Sin información		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	Formulario de envío de muestras a laboratorio de verificación sin número.
Exámenes solicitados		Histología y PCR		
Tipo de muestra		Muestras de órganos en formalina bufferizada al 10%	Especie	<i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra				
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	5 tubos con órganos (corazón, riñón, branquias, músculo) en formalina al 10% código muestras AB-89 del 1 al 5	
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote (si aplica)	Sin información	
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información			
Fecha del muestreo	16.12.15	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información	
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)	Sin información			
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.				



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 34/15 Código muestras AB-89: 1 al 5	Pool de órganos	Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: 30.01.15		Fecha término ensayos: 21.01.16
Hallazgos y conclusiones: Ver informe de examen histológico.		

**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)  
Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

La mayoría de las muestras presentaron diversos grados de autólisis, desde moderada a marcada, también se detectó edema en los órganos, que es el hallazgo histológico de SIT. Otras lesiones son generales no atribuibles a causa específica y se descarta HSMI.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 27 de Enero de 2015.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 660-15-E (CASO 34/15)  
FECHA ENVÍO: 30 de diciembre de 2015  
PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Trucha (*Oncorhynchus mykiss*)

**ANAMNESIS:** Se analizan 5 set de muestras de corazón, hígado, músculo esquelético y riñón, correspondientes al Caso 34/15, enviadas en el marco del proyecto FIP 2014/61, desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón, hígado, músculo esquelético y riñón, fijados en formalina al 10%. Código de las muestras:

- AB-89-1: 660-15-E-1
- AB-89-2: 660-15-E-2
- AB-89-3: 660-15-E-3
- AB-89-4: 660-15-E-4
- AB-89-5: 660-15-E-5

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

N° Caso Anatomía Patológica	Órganos			
	Corazón	Hígado	Músculo esquelético	Riñón
660-15-E-1	Autólisis + Epicarditis mononuclear + Edema + en miocardio compacto	Autólisis +++ Atrofia ++ Degeneración y necrosis + Proliferación fibroblástica periportal +	S/A	Autólisis +++
660-15-E-2	N/O	Autólisis +++ Atrofia + Inf infl mononuclear periportal +	Autólisis ++ S/A	Autólisis ++++
660-15-E-3	Epicarditis mononuclear + Edema + en miocardio compacto	Cong ++++ Esteatosis ++ Pigmento negruzco en citoplasma hepatocitos ++	N/O	Cong +++ Glomerulonefritis +
660-15-E-4	Epicarditis mononuclear + Edema + en miocardio compacto	Autólisis ++ Esteatosis + Cong ++	Autólisis ++ S/A	Autólisis ++++ Cong +++ Nefrocalcinosis +
660-15-E-5	N/O	Autólisis +++ Cong ++	Autólisis ++++	Autólisis +++

+: Leve; ++: Moderado; +++: Marcado; ++++: Severo; S/A: sin alteraciones; N/O: no observado (órgano ausente).  
Inf infl: infiltrado inflamatorio; Cong: congestión.

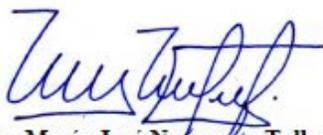
**Corazón:** En el total de las muestras disponibles (n=3) fue posible observar epicarditis mononuclear difusa, en grado leve. Además, se observó un edema difuso leve, que abarcaba la capa compacta del miocardio.

**Hígado:** La mayoría de las muestras presentaron diversos grados de autólisis, desde moderada a marcada. Las lesiones observadas principalmente comprendieron trastornos circulatorios, como edema y congestión. Además, se pudo observar degeneración y necrosis leve en la zona periportal acompañados de una proliferación fibroblástica (muestra 660-15-E-1), una leve infiltración de células mononucleares focalizada en la zona periportal (muestra 660-15-E-2) y esteatosis (muestras 660-15-E-3 y 660-15-E-4).

**Músculo esquelético:** En el total de las muestras disponibles (n=4) no se observaron cambios patológicos, pero si se observaron cambios atribuibles a diversos grados de autolisis, desde moderada a severa.

**Riñón:** Todas las muestras presentaron diversos grados de autolisis (marcada a severa). Fue posible observar una glomerulonefritis leve (660-15-E-3), con presencia de células mononucleares en glomérulo y una leve degeneración tubular. Además se observó congestión marcada y nefrocalcinosis (muestra 660-15-E-4).

**CONCLUSIÓN:** El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI).



**Dra. María José Navarrete Talloni**  
M.V., M.P.V.M., Ph.D.  
Laboratorio de Anatomía Patológica  
Instituto de Patología Animal  
Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 21.01.16.-



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Marcela Lara, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIP 2014-61 (Muestras SIT)

Nº Caso		35/15 INFORME FINAL		
Fecha recepción de las muestras		30.12.15	Fecha emisión del informe	26.02.16
Empresa		Servicio Nacional de Pesca		
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		Sin información		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	Formulario de envío de muestras a laboratorio de verificación sin número.
Exámenes solicitados		Histología y PCR		
Tipo de muestra		Muestras de órganos en: RNALater y formalina bufferizada al 10%	Especie	<i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra		Tº muestras 7,4ºC/Unidades refrigerantes: En descongelación		
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	3 tubos con órganos(corazón, riñón) en RNALater (código muestras HW00 del 1 al 3) 3 tubos con órganos (no se indica los órganos que componen el pool) en formalina al 10% (código muestras HW00 del 4 al 6)	
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote (si aplica)	Sin información	
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información			
Fecha del muestreo	22.12.15	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información	
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)	Sin información			
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.				



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotechnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



RESULTADOS DE ENSAYOS						
BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 35/15	RT PCR VHS	1 A	Individual	Corazón Riñón	No Aplica	Negativo
		2 A	Individual	Corazón Riñón	No Aplica	Negativo
		3 A	Individual	Corazón Riñón	No Aplica	Negativo
Caso 35/15	RT PCR IHN	1 A	Individual	Corazón Riñón	No Aplica	Negativo
		2 A	Individual	Corazón Riñón	No Aplica	Negativo
		3 A	Individual	Corazón Riñón	No Aplica	Negativo

Fecha de inicio ensayos: 26/1/16  
Fecha término ensayos: 03/2/16  
METODOLOGÍA UTILIZADA:  
RT PCR IHN, VHS, Partidores Williams, 1999.  
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica  
OBSERVACIONES:

HISTOLOGÍA		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 35/15 Código muestras HW00 del 4 al 6	Pool de órganos	Muestras individuales

Fecha de inicio ensayos: 30.12.15  
Fecha término ensayos: 21.01.16  
Hallazgos y conclusiones: Ver informe de examen histológico.

OPINIONES*, INTERPRETACIONES*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
(*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)
Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:
Resultado histológico no corresponde a SIT, como tampoco a HSMI. Test de biología molecular descarta virus exóticos VHS e IHN.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
Jefe de Laboratorio  
Laboratorio de Biotechnología y Patología Acuática  
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Valdivia, 26 de Febrero de 2016.

Versión: 03	Fecha : 21 de Enero de 2014
-------------	-----------------------------



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 661-15-E (CASO 35/15)

FECHA ENVÍO: 30 de diciembre de 2015

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Trucha (*Oncorhynchus mykiss*)

**ANAMNESIS:** Se analizan 3 set de muestras de corazón, hígado, músculo esquelético, riñón, intestino, ciegos pilóricos y páncreas, correspondientes al Caso 35/15, enviadas en el marco del proyecto FIP 2014/61, desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón, hígado, músculo esquelético, riñón, intestino, ciegos pilóricos y páncreas, fijados en formalina al 10%.

Rótulo de los tubos: 1B, 2B y 3B.

Código de las muestras:

- HW004: 661-15-E-1
- HW005: 661-15-E-2
- HW006: 661-15-E-3

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

Nº Caso Anatomía Patológica	Órganos						
	Corazón	Hígado	Músculo esquelético	Riñón	Intestino	Ciegos pilóricos	Páncreas
661-15-E-1	Epicarditis mononuclear +++	Atrofia + Esteatosis +++	Autólisis ++ S/A	S/A	S/A	Necrosis células epiteliales +	Atrofia ++
661-15-E-2	S/A	S/A	Autólisis + S/A	S/A	S/A	S/A	Atrofia ++
661-15-E-3	S/A	Cong +++	S/A	S/A	S/A	S/A	Atrofia +++

+: Leve; ++: Moderado; +++: Marcado; ++++: Severo; S/A: sin alteraciones; N/O: no observado (órgano ausente);  
Cong: congestión.

**Corazón:** En la muestra 661-15-E-1 fue posible observar una marcada epicarditis mononuclear difusa.

**Hígado:** Hallazgos tales como atrofia leve y esteatosis son inespecíficos y carecen de importancia patológica. La congestión marcada observada en la muestra 661-15-E-3 era difusa.

**Músculo esquelético:** En el total de las muestras no se observaron cambios patológicos, pero sí se observaron cambios atribuibles a diversos grados de autólisis, desde leve a moderada.

**Riñón:** No se observaron alteraciones en ninguna de las muestras

**Intestino:** No se observaron alteraciones en ninguna de las muestras

**Ciegos pilóricos:** Una sola muestra presentó la necrosis de células epiteliales aisladas (muestra 661-15-E-1).

**Páncreas:** Todas las muestras presentaron diversos grados de atrofia (moderada a marcada).

**CONCLUSIÓN:** El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI).



**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 21.01.16.-

## Anexo 8: PRV salmónidos silvestres

Se incluyen los informes de casos del año 2015: 01/15, 04/15 y 26/15 de muestras de salmónidos silvestres colectadas por el IFOP. Se indican los resultados de RT PCR-PRV y examen histológico de los peces muestreados.

### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		01/15 INFORME FINAL V00		
Fecha recepción de las muestras		05.02.15	Fecha emisión del informe	07.05.2015
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO		
Dirección		Calle Bernardo O`Higgins 246, Puerto Montt		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		Nº Guía despacho 16934	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV –Histología		
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie	<i>S. salar</i> Peces silvestres Lago Llanquihue-contramuestra
Condición de la muestra		Sin información		
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información		Nº de muestras/ peces	1 pool de órganos para PCR 1 órgano (corazón) para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información		Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información		
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información	
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.				

**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 01/15 (L1-34)	RT PCR PRV (L1)	L1 34	Sin información	Sin información	24,4	Positivo

Fecha de inicio ensayos: 27/03/2015

Fecha término ensayos: 15/04/2015

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:

\*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: CT 34,9

Valor CT ELF elevado (>24) puede indicar descomposición de la muestra o que ésta no corresponde a salmón del Atlántico.

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 01/15 L134	Corazón (1)	1

Fecha de inicio ensayos:

Término ensayos:

Hallazgos y conclusiones: en informe adjunto

**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta reacción genómica del fragmento L1 de PRV, nivel de CT indica resultado positivo. Muestra histológica (solo corazón) detecta infiltración compatible con HSMI a nivel de pericardio y endocardio, sin embargo además describe área de necrosis que no es compatible con HSMI. Como no se incluye muestra de musculatura esquelética no es posible definir caso de HSMI.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 07 de 05 de 2014.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA CHILE

	CASO N°:	135-15-E
	FECHA:	29 de abril de 2015
	PATÓLOGO:	Dra. María José Navarrete Talloni.
ENVIADO POR :	DR. VANIA QUINTEROS (BIOTECNOLOGÍA Y PATOLOGÍA ACUÁTICA, UACH)	
FECHA DE EXAMEN:	24 de ABRIL de 2015	
ESPECIE:	Salmo salar	

**ANAMNESIS:** Se recibe una muestra de corazón, correspondiente al caso 01/15, rotulada como L134. Se solicita detectar infiltración linfocitaria y se indica sospecha de HSMI.

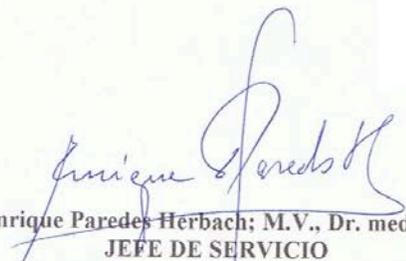
**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA:**

**Corazón:** Se observa un moderado infiltrado inflamatorio mononuclear, predominantemente linfocitario en epicardio, difuso. A nivel del miocardio compacto y esponjoso se observa un leve infiltrado mononuclear con predominio linfocitario, distribuido difusamente y en el miocardio esponjoso también se observan focos pequeños. Un sector del miocardio presenta un área de necrosis leve, con detritus celular, acumulación de material proteico con pérdida de la arquitectura normal del órgano.

**CONCLUSIÓN:** En la muestra se observaron lesiones inflamatorias infiltrativas las que son indicativas de un proceso infeccioso de carácter agudo. Las lesiones inflamatorias observadas en miocardio y epicardio podrían ser indicativas de un proceso de origen viral, cuya causa más probable es Piscine reovirus (PRV).

Al respecto de la lesión necrótica observada en miocardio, no es una lesión característica de HSMI.

Probablemente se trata de un cuadro de HSMI incipiente, pero el diagnóstico definitivo debe ser complementado con un análisis histopatológico de músculo rojo.

  
Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
JEFE DE SERVICIO

Servicio de Anatomía Patológica  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero. Por Proyecto FIP 2014-61.

Nº Caso	04/15 INFORME FINAL V00		
Fecha recepción de las muestras	21.04.15	Fecha emisión del informe	29.10.2015
Empresa	INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO		
Dirección	Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)	No aplica		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo	No aplica		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)	Nº Guía despacho 17134	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	No aplica
Exámenes solicitados	PCR PRV - Histología		
Tipo de muestra	pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie	<i>S. salar</i> (x5)=L15 -17-20-21-22-24. <i>O. kisutch</i> (x6)=L16 -04;L15 -01-02-03-12-30. <i>O. mykiss</i> (x1)=L15 -16.
Condición de la muestra	Tª muestra 5,5 °C/ Unidades refrigerantes : En descongelación		
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	12 pool de órganos para PCR 12 pool órganos para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información		
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)	Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



### RESULTADOS DE ENSAYOS

#### BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 04/15	RT PCR PRV (L1)	L16-04	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	33,23	Positivo
		L15-01	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	34,61	Negativo
		L15-02	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	34,59	Negativo
		L15-03	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	26,87	Positivo
		L15-12	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	31,49	Positivo
		L15-16	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	No CT	Negativo
		L15-17	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	30,25	Positivo
		L15-20	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	35,06	Negativo
		L15-21	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	22,91	Positivo
		L15-22	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	32,04	Positivo
		L15-24	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	32,69	Positivo
		L15-30	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	37,99	Negativo

Fecha de inicio ensayos: 30/09/15

Fecha término ensayos: 07/10/15

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real HSM1 Fragmento L1, Palacios 2010.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:

\*Riñón (Ri), Bazo (Ba), Branquia (Bra) y Corazón (Co).

El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: Rango de CT 26,3-27,2 (Podría indicar muestras en regular estado)

#### HISTOLOGÍA

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 04/15	Corazón	1

Fecha de inicio ensayos: Sin información      Término ensayos: 29.10.15  
Hallazgos y conclusiones: Ver informe histológico (Se adjunta)



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta mediante RT-PCR PRV positividad en 3 muestras de salmón coho y 4 de salmón del Atlántico. Negatividad con nivel de CT 2 muestras de salmón coho y 2 de salmón del Atlántico. La muestra de trucha arcoíris resultó negativa sin CT. Histológicamente los hallazgos observados en tejido cardíaco no son los clásicos asociados a HSMI. No es posible definir HSMI sino se incluye en las muestras correspondientes tejido muscular para el examen histológico.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**



Valdivia, 29 de Octubre de 2015.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 154 a 165-15-E (CASO 04/15)

FECHA: 29 de octubre de 2015

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Salmón Atlántico (*Salmo salar*)

**ANAMNESIS:** Se analizan 7 muestras de corazón, correspondientes al Caso 04/15, enviadas en el marco del proyecto FIP, desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Los tejidos corresponden a secciones de corazón, fijados en formalina al 10%. Las muestras enviadas presentaron PCR positivas para virus PRV.

Código de las muestras:

- L16-04: 154-15-E
- L15-12: 157-15-E
- L15-17: 159-15-E
- L15-21: 161-15-E
- L15-22: 162-15-E
- L15-24: 163-15-E
- L15-03: 165-15-E

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

N° Caso Anatomía Patológica	Código muestras	Corazón				
		Epicarditis mononuclear	Miocarditis mononuclear capa compacta	Miocarditis mononuclear capa esponjosa	Congestión	Otros
154-15-E	L16-04	S/A	S/A	S/A	S/A	
157-15-E	L15-12	S/A	S/A	+ difusa	S/A	
159-15-E	L15-17	+	+	+	S/A	
161-15-E	L15-21	+	+	+	S/A	2 focos inflamación mononuclear + en atrio
162-15-E	L15-22	S/A	S/A	S/A	S/A	
163-15-E	L15-24	+	+	+	S/A	
165-15-E	L15-03	+	S/A	S/A	+ en epicardio	

+: Leve; ++: Moderado; +++: Marcado; ++++: Severo; S/A: sin alteraciones; N/O: no observado (órgano ausente).

**Corazón:** En 4 de las 7 muestras fue posible observar epicarditis mononuclear difusa, en grado leve. Además, se observó en el miocardio de algunas de las muestras, un infiltrado mononuclear difuso, leve. Este infiltrado inflamatorio abarcaba la capa compacta y/o la capa esponjosa, en grado leve. En uno de los casos (muestra 161-15-E) se observaron también dos focos pequeños de células mononucleares en el atrio. Sólo se observó congestión en el epicardio de una de las muestras (165-15-E), distribuido de manera difusa y de severidad leve.

**CONCLUSIÓN:** Los hallazgos observados en corazón corresponden principalmente a cambios inflamatorios de tipo mononuclear, leve. El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras o que estos animales se encuentren en una fase inicial de la enfermedad, cuando aún no es posible observar las lesiones más generalizadas y de mayor intensidad.

Se recomienda la observación conjunta de corazón y músculo esquelético, lo que facilita un diagnóstico histopatológico más completo, especialmente frente a la sospecha de casos clínicos de HSMI.



**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		26/15 INFORME FINAL V01	
Fecha recepción de las muestras		01.10.15	Fecha emisión del informe 10.11.2015
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		Nº Guía despacho	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV - Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>S. salar</i> (x7) L15: -64, -107. L11: -140,-152,-154. L1: -122. L9: -91 <i>O. kisutch</i> (x1) L15: -11 <i>O. mykiss</i> (x1) L5: -156
Condición de la muestra		Tª muestra °C/ Unidades refrigerantes : En descongelación	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	9 pool de órganos para PCR 9 tubos órganos para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 26/15	RT PCR PRV (L1)	L1-122	Individual	Ri, Bra, Co (*)	31,9	Positivo
		L5-156	Individual	Ri, Bra, Co (*)	29,6	Positivo
		L9-91	Individual	Ri, Bra, Co (*)	34,6	Negativo
		L11-140	Individual	Ri, Bra, Co (*)	33,5	Positivo
		L11-152	Individual	Ri, Bra, Co (*)	30,5	Positivo
		L11-154	Individual	Ri, Bra, Co (*)	31,8	Positivo
		L15-11	Individual	Ri, Bra, Co (*)	No CT	Negativo
		L15-64	Individual	Ri, Bra, Co (*)	28,9	Positivo
L15-107	Individual	Ri, Bra, Co (*)	33,9	Positivo		

Fecha de inicio ensayos: 19/10/15

Fecha término ensayos: 19/10/15

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**

\*Riñón (Ri), Branquia (Bra) y Corazón (Co).

El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas

ELF: Rango de CT 22,0 - 30,6 (Podría indicar muestras en regular estado)

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 026/15	corazón	1

Fecha de inicio ensayos: Sin información      Término ensayos: 04.11.15  
Hallazgos y conclusiones: Ver informe Histológico (Se adjunta)



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta mediante RT PCR-PRV positividad en 6 muestras de salmón del Atlántico y en la muestra de trucha arcoíris. Negatividad con CT en 1 muestra de salmón del Atlántico. La muestra de salmón coho resultó negativa sin CT. Histológicamente los hallazgos observados en tejido cardíaco no son los clásicos asociados a HSMI. No es posible definir HSMI sino se incluye en las muestras correspondientes tejido muscular para el examen histológico.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 10 de Noviembre de 2015.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 588-15-E, 589-15-E, 590-15-E,  
591-15-E, 592-15-E, 593-15-E, 594-15-E  
y 601-15-E (CASO 26/15)

FECHA ENVÍO: 1 de octubre de 2015 / 7 de octubre 2015

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss*

**ANAMNESIS:** Se reciben 9 tubos correspondientes al Caso 26/15, por parte del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Los tejidos enviados pertenecen a muestras sospechosas de HSMI, Proyecto FIP-2015 y corresponden a secciones de corazón, fijados en formalina al 10%.

Las muestras analizadas en este informe presentaron PCR positivas para virus PRV.

Código de las muestras:

- L15-64 (*S. salar*) : 588-15-E
- L15-107 (*S. salar*) : 589-15-E
- L15-122 (*S. salar*) : 590-15-E
- L15-140 (*S. salar*) : 592-15-E
- L15-152 (*S. salar*) : 593-15-E
- L15-154 (*S. salar*) : 594-15-E
- L5-156 (*O. mykiss*): 601-15-E

#### DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA

**Corazón:** Sólo se observaron lesiones en 1 de las 6 muestras (588-15-E, L15-64), donde fue posible observar una epicarditis mononuclear difusa, en grado leve, presentando la infiltración de células de tipo mononuclear, individuales, distribuidas a lo largo de todo el epicardio, agrupándose en ciertas áreas.

**CONCLUSIÓN:** El hallazgo observado en corazón de la muestra 588-15-E (L15-64) corresponde a un cambio inflamatorio de tipo mononuclear, leve. El tipo de lesión observada, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras.

Se recomienda la observación conjunta de corazón y músculo esquelético para realizar un diagnóstico histopatológico más completo frente a la sospecha de casos clínicos de HSMI.

Dra. María José Navarrete Talloni  
M.V., M.P.V.M., Ph.D.  
Laboratorio de Anatomía Patológica  
Instituto de Patología Animal  
Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 04.11.15.-

## Anexo 9: Informes de casos 03/16, 05/16, 11/16 y 17/16

de muestras de salmónidos silvestres colectadas por el IFOP. Se indican los resultados de RT PCR-PRV y de examen histológico de corazón de los peces muestreados.



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso	03/16 INFORME		
Fecha recepción de las muestras	16.03.16	Fecha emisión del informe	31.05.2016
Empresa	INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO		
Dirección	Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)	No aplica		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo	No aplica		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)	467	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	No aplica
Exámenes solicitados	PCR PRV - Histología		
Tipo de muestra	pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie	<i>S. salar</i> - <i>O mykiss</i> Peces de vida libre
Condición de la muestra	Sin información		
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	6
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información		
Fecha del muestreo	15.03.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)	Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

<b>BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)</b>						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
03/16	PCR tiempo Real PRV (HSMI)	L1-8	1	Riñón, bazo, corazón, branquias.	27,95	<b>Positivo</b>
		L1-9	1	Riñón, bazo, corazón, branquias.	24,42	<b>Positivo</b>
		L1-11	1	Riñón, bazo, corazón, branquias.	29,04	<b>Positivo</b>
		L1-12	1	Riñón, bazo, corazón, branquias.	28,97	<b>Positivo</b>
		L1-13	1	Riñón, bazo, corazón, branquias.	27,35	<b>Positivo</b>
		L1-15	1	Riñón, bazo, corazón, branquias.	28,92	<b>Positivo</b>
		C-	1	-	No CT	Negativo
		C+	PRV	-	6,73	Positivo
<p>Fecha de inicio ensayos: 23-05-2016 <span style="float: right;">Fecha término ensayos: 30-05-2016</span>            METODOLOGÍA UTILIZADA: Palacios et al., 2010, segmento L1.            IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.            Nivel de incertidumbre asociada: No aplica            OBSERVACIONES            Control positivo (C+), Control negativo (C-) (**)            El CT de corte para Fragmento L1 es corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)            ELF: CT 33,4 – 31,3</p>						



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detectó la presencia de RNA genómico de PRV en las muestras analizadas. El examen histológico no permite confirmar HSML.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 31 de Mayo de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA CHILE

CASO N°:	74 al 79-16-E
FECHA:	31 de marzo de 2016
PATÓLOGO:	Dr. Esteban Reyes
PROPIETARIO :	LAB. DE BIOTECNOLOGÍA Y PATOLOGÍA ACUÁTICA
DIRECCIÓN :	UACH Campus Teja
SOLICITADO POR:	DR. RICARDO ENRÍQUEZ
FECHA DE EXAMEN:	21 de marzo de 2016
ESPECIE: <i>O. mykiss</i> / <i>S. salar</i>	SEXO: -
RAZA: -	EDAD: -

**ANTECEDENTES:** Muestras de 6 especímenes silvestres, *Oncorhynchus mykiss* x 4 y *Salmo salar* x 2 para confirmar diagnóstico de HSMI mediante análisis histopatológico. Las muestras corresponden al número de caso 3/16 del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

**CASO 74-16-E (L1-11) – *Oncorhynchus mykiss***

**Músculo:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Se observan trazas de infiltrado linfocítico en el epicardio visceral.

**CASO 75-16-E (L1-13) – *Oncorhynchus mykiss***

**Músculo:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Se observan trazas de infiltrado linfocítico en el epicardio visceral.

**CASO 76-16-E (L1-9) – *Oncorhynchus mykiss***

**Músculo:** Se observan trazas de infiltrado linfocítico en a nivel de la dermis.

**Corazón:** Se observa leve infiltrado linfocítico en el epicardio visceral.

**CASO 77-16-E (L1-8) – *Oncorhynchus mykiss***

**Músculo:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Se observa leve infiltrado linfocítico en el epicardio visceral.

**CASO 78-16-E (L1-12) – *Salmo salar***

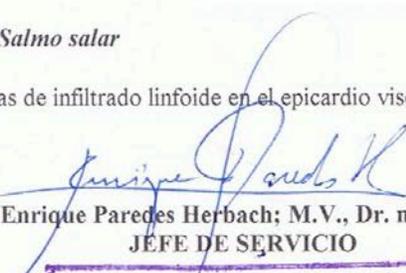
**Músculo:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Sin alteraciones.

**CASO 79-16-E (L1-15) – *Salmo salar***

**Músculo:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Se observan trazas de infiltrado linfocítico en el epicardio visceral.

  
Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
JEFE DE SERVICIO

Servicio de Anatomía Patológica  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		05/16 PRE INFORME	
Fecha recepción de las muestras		20.04.16	Fecha emisión del informe 06.06.2016
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O`Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		541	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV - Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>O. kistuch</i> Peces de vida libre
Condición de la muestra		Tº muestra: 8,6 °C / Unidades refrigerantes : en descongelación	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	1 pool de órganos para PCR 1 pool de órganos para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información		
Fecha del muestreo	19.04.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)	Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

<b>BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)</b>							
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados		
					CT	Interpretación*	
Caso 05/16	RT PCR PRV (L1) 1er análisis	L15-41	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	33,26	Negativo	
		C- (**)	-		No CT	Negativo	
		C+PRV (**)	-		6,73	Positivo	
	RT PCR PRV (L1) 2do análisis	L15-41	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	33,45	Negativo	
		C- (**)	-		No CT	Negativo	
		C+PRV (**)	-		6,77	Positivo	
	RT PCR PRV (L1) 3er análisis	L15-41	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	34,23	Negativo	
		L15-41	Individual		Ri, Ba, Co, Br. (*)	34,93	Negativo
		C- (**)	-		No CT	Negativo	
		C+PRV (**)	-	8,96	Positivo		
Fecha de inicio ensayos: 23/05/2016				Fecha término ensayos: 06/06/2016			
METODOLOGÍA UTILIZADA:							
RT PCR Tiempo Real HSM1 Fragmento L1, Palacios 2010.							
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.							
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica							
OBSERVACIONES:							
Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Br). (*)							
El análisis fue realizado en 3 ocasiones.							
Control positivo (C+), Control negativo (C-) (**)							
El CT de corte para Fragmento L1 es correspondiente a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)							
ELF: CT 26,06 a 28,91							

<b>HISTOLOGÍA</b>		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 05/16	Corazón y músculo	Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: Sin información		Fecha término ensayos: 08.06.16
Hallazgos y conclusiones: Ver informe de examen histológico		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

El análisis efectuado en 3 oportunidades detecta niveles de RNA mensajero, que no permiten definir las muestras como positivas, sin embargo, enviaremos a secuenciar estos productos de PCR para determinar con certeza si corresponden a PRV, dado que el examen histológico sugiere HSMI, aun cuando no se especifica que corresponda a HSMI.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 06 de Junio de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA CHILE

CASO N°:	92-16-E
FECHA:	08 de junio de 2016
PATÓLOGO:	Dr. Esteban Reyes
PROPIETARIO :	LAB. DE BIOTECNOLOGÍA Y PATOLOGÍA ACUÁTICA
DIRECCIÓN :	UACH Campus Teja
SOLICITADO POR:	DR. RICARDO ENRÍQUEZ
FECHA DE EXAMEN:	08 de junio de 2016
ESPECIE: <i>O. kisutch</i>	SEXO: -
RAZA: -	EDAD: -

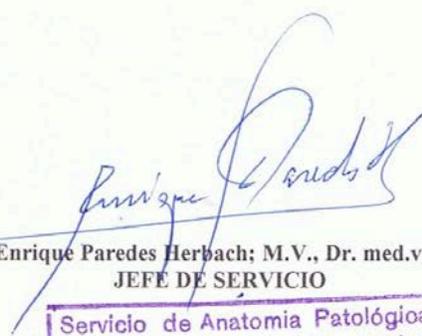
**ANTECEDENTES:** Muestras de 1 espécimen *Oncorhynchus kisutch* para confirmar diagnóstico de HSMI mediante análisis histopatológico. La muestra corresponde al número de caso 5/16 del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

#### DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA

**CASO 92-16-E (L15-41) – *Oncorhynchus kisutch***

**Músculo:** Se observan trazas de infiltrado linfoide en tejido muscular.

**Corazón:** Se observan trazas de infiltrado linfoide en el epicardio visceral y leve infiltrado linfoide en los estratos compacto y esponjoso.

  
Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
JEFE DE SERVICIO

Servicio de Anatomía Patológica  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		11/16 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		24.04.16	Fecha emisión del informe 16.06.2016
Empresa INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO			
Dirección Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt			
Centro o lugar del muestreo (si aplica) No aplica			
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo No aplica			
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		634	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados PCR PRV -Histología			
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>O mykiss</i> <i>S. coho</i> Peces silvestres
Condición de la muestra Tº muestra:10ºC /Unidades refrigerantes: en descongelación			
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información		Nº de muestras/ peces pool de órganos para PCR pool de órganos para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información		Lote (si aplica) Sin información
Muestreo realizado por (si aplica) Sin información			
Fecha del muestreo	16.05.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica) Sin información			
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

<b>BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)</b>						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 11/16	RT PCR PRV (L1)	L16-5	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	31,28	<b>Positivo</b>
		L16-43	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	29,34	<b>Positivo</b>
		L16-47	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	31,99	<b>Positivo</b>
		L16-61	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	30,30	<b>Positivo</b>
		L16-64	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	30,77	<b>Positivo</b>
		C-	-	-	No CT	Negativo
		C+PRV	-	-	6,77	Positivo
Fecha de inicio ensayos: 31/05/2016				Fecha término ensayos: 07/06/2016		
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Br). (*)						
El CT de corte para Fragmento L1 es corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
EIF: Rango CT 29,09 – 36,02						

<b>HISTOLOGÍA</b>		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 11/16	Corazón y músculo	Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: Sin información		Fecha término ensayos: 09.06.16
Hallazgos y conclusiones: Ver informe histológico		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta RNA mensajero de PRV en las muestras analizadas. El examen histológico no permite confirmar HSMI.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 16 de Junio de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA CHILE

CASO N°:	198 al 202-16-E
FECHA:	09 de junio de 2016
PATÓLOGO:	Dr. Enrique Paredes H.
PROPIETARIO :	LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y PATOLOGÍA ACUÁTICA
DIRECCIÓN :	UACH Campus Teja
SOLICITADO POR:	DR. RICARDO ENRÍQUEZ
FECHA DE EXAMEN:	01 de junio de 2016
ESPECIE: <i>O. mykiss</i> / <i>O. kisutch</i>	SEXO: -
RAZA: -	EDAD: -

**ANTECEDENTES:** Muestras de 5 especímenes, *Oncorhynchus mykiss* x 1 (silvestre) y *Oncorhynchus kisutch* x 4 (silvestres) para confirmar diagnóstico de HSMI mediante análisis histopatológico.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

**CASO 198-16-E (L16-5) – *Oncorhynchus mykiss* (silvestre)**

**Piel y musculatura:** En la capa más superficial de la musculatura se aprecia pequeño foco de necrosis con leve infiltrado inflamatorio mixto, similar infiltrado se aprecia en forma leve en musculatura superficial.

**Corazón:** Sin alteraciones.

**CASO 199-16-E (L16-43) – *Oncorhynchus kisutch* (silvestre)**

**Piel y musculatura:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Se observa leve de infiltrado linfocitario en el epicardio visceral.

**CASO 200-16-E (L16-47) – *Oncorhynchus kisutch* (silvestre)**

**Piel y musculatura:** Se observa leve infiltrado linfocitario a nivel de musculatura superficial.

**Corazón:** Sin alteraciones.

**CASO 201-16-E (L16-61) – *Oncorhynchus kisutch* (silvestre)**

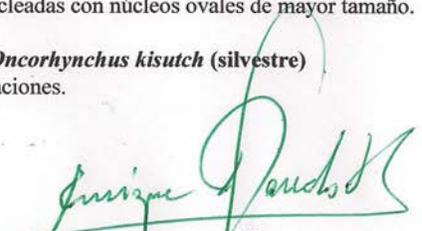
**Piel y musculatura:** Presencia de focos aislados con trazas de infiltrado linfocitario a nivel de musculatura superficial.

**Corazón:** En estrato esponjoso se observan focos aislados con trazas de infiltrado linfocitario, en un área focal aparecen células multinucleadas con núcleos ovales de mayor tamaño.

**CASO 202-16-E (L16-64) – *Oncorhynchus kisutch* (silvestre)**

**Piel y musculatura:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Sin alteraciones.

  
Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
JEFE DE SERVICIO

Servicio de Anatomía Patológica  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		17/16 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		08.06.16	Fecha emisión del informe 30.06.2016
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		673	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV -Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>S. salar</i> <i>O. kisutch</i> Peces silvestres
Condición de la muestra		Tº muestra: 4,2 °C /Unidades refrigerantes: congeladas	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	pool de órganos para PCR pool de órganos para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	23.05.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados		
					CT	Interpretación	
Caso 17/16	RT PCR PRV (L1)	M1-79	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	31,95	<b>Positivo</b>	
		L1-114	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	33,35		
		L1-137	Individual	Ri, Ba, Co, Br. (*)	26,65		
		C- (**)	-	-	No CT		Negativo
		C+PRV (**)	-	-	9,79		Positivo
Fecha de inicio ensayos: 20/06/2016					Fecha término ensayos: 21/06/2016		
METODOLOGÍA UTILIZADA:							
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.							
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.							
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica							
<b>OBSERVACIONES:</b>							
Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Br). (*)							
El CT de corte para Fragmento L1 es correspondiente a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)							
Control negativo (C-), Control positivo (C+) (**)							
ELF: Rango CT 25,95-30,84							

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 17/16	Corazón y músculo	Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: 08. Junio. 2016		Fecha término ensayos: 30. Junio. 2016
Hallazgos y conclusiones: En Informe Histopatológico adjunto		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)  
Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Las muestras (M1-79) de *S. salar* son positivas a PRV mediante RT qPCR, sin embargo, histológicamente no se detectó HSMI. Una de las muestras de *O. kisutch* (L1-137) es positiva a PRV mediante RT qPCR con un nivel de CT positivo que se confirma histológicamente como HSMI. En la muestra de *O. kisutch* L1-114 se detecta nivel de CT negativo mediante RT qPCR de PRV e histológicamente no se detectó HSMI.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 30 de Junio de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA CHILE

CASO N°:	255 al 257-16-E
FECHA:	30 de junio de 2016
PATÓLOGO:	Dr. Enrique Paredes H.
PROPIETARIO :	LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y PATOLOGÍA ACUÁTICA
DIRECCIÓN :	UACH Campus Teja
SOLICITADO POR:	DR. RICARDO ENRÍQUEZ
FECHA DE EXAMEN:	08 de junio de 2016
ESPECIE: <i>S. salar</i> / <i>O. kisutch</i>	SEXO: -
RAZA: -	EDAD: -

**ANTECEDENTES:** Muestras de 3 especímenes, *Salmo salar* x 1 (silvestre) y *Oncorhynchus kisutch* x 2 (silvestres) para confirmar diagnóstico de HSMI mediante análisis histopatológico.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

**CASO 255-16-E (M1-79) – *Salmo salar* (silvestre)**

**Piel y musculatura:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Sin alteraciones.

**CASO 256-16-E (L1-137) – *Oncorhynchus kisutch* (silvestre)**

**Piel y musculatura:** En la musculatura debajo de la piel se aprecian focos con infiltrado inflamatorio mononuclear.

**Corazón:** Se observa moderado infiltrado mononuclear en el epicardio. En el estrato compacto se aprecian focos de infiltrado inflamatorio mononuclear. En el estrato esponjoso se encuentran focos con infiltrado inflamatorio mononuclear.

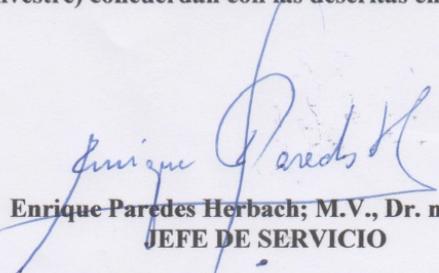
**CASO 257-16-E (L1-114) – *Oncorhynchus kisutch* (silvestre)**

**Piel y musculatura:** Sin alteraciones.

**Corazón:** Leve epicarditis mononuclear.

**CONCLUSIÓN:**

Las lesiones encontradas en corazón y músculo del caso 256-16-E (L1-137) – *Oncorhynchus kisutch* (silvestre) concuerdan con las descritas en los casos de HSMI.

  
Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
JEFE DE SERVICIO

Servicio de Anatomía Patológica  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile

## Anexo 10: Informe de casos 29/16, 32/16, 40/16, 03/17, 11/17 y 14/17

de muestras de salmónidos silvestres colectadas por el IFOP. Se indican los resultados de RT PCR-PRV y de examen histológico de los peces muestreados



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		29/16 PRE INFORME V00	
Fecha recepción de las muestras		17.08.16	Fecha emisión del informe 24.08.16
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		864	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV - Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>O. mykiss</i> (L9)x2 <i>S. coho</i> (L16)x1 Peces silvestres
Condición de la muestra		Tº muestra: 10,4 °C /Unidades refrigerantes: congeladas	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	pool de órganos :bazo , corazón y branquias para PCR pool de órganos :para Histología: corazón y músculo.
Grupo (si aplica)	L16:Lago Puyehue L9:Lago Colico	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

<b>BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)</b>						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 29/16	RT PCR PRV (L1)	L9-93	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	30,85	Positivo
		L9-98	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	32,09	Positivo
		L16-92	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	21,49	Positivo
		C- (**)			NoCT	Negativo
		C+PRV (**)			9,93	Positivo
Fecha de inicio ensayos: 18/08/2016				Fecha término ensayos: 22/08/2016		
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Bra). (*)						
Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (**)						
El CT de corte para Fragmento L1 es correspondiente a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
EIF : CT 25,65 – 26,81						

<b>HISTOLOGÍA</b>		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 29/16	Corazón y músculo	Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: ----		Fecha término ensayos: Pendiente
Hallazgos y conclusiones: Pendiente		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Las muestras de salmónidos silvestres (*O. mykiss* y *O. kisutch*) son positivas a PRV mediante qPCR-PRV. El Ct detectado indica replicación viral activa. Examen histológico pendiente.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 24 de Agosto de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		32/16 PRE INFORME V00	
Fecha recepción de las muestras		07.09.16	Fecha emisión del informe 18.11.16
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		945	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV - Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>O. mykiss</i> Peces silvestres
Condición de la muestra		Tª muestra: 7°C /Unidades refrigerantes: congeladas	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	pool de órganos :bazo , corazón y branquias para PCR pool de órganos :para Histología: corazón y músculo.
Grupo (si aplica)	L10:Lago Villarica	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 32/16	RT PCR PRV (L1)	L10-140	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	28,94	Positivo
		L10-143	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	31,60	Positivo
		C- (**)			NoCT	Negativo
		C+PRV (**)			14,12	Positivo
Fecha de inicio ensayos: 29/09/2016				Fecha término ensayos: 05/10/2016		
METODOLOGÍA UTILIZADA: RT PCR Tiempo Real HSM1 Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Bra). (*)						
Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (**)						
El CT de corte para Fragmento L1 es corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
EIF : CT 28,74 – 29,04						

HISTOLOGÍA		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 32/16	Corazón y músculo	Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: ----		Fecha término ensayos: Pendiente
Hallazgos y conclusiones: Pendiente		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Las muestras de salmónidos silvestres (*O. mykiss*) son positivas a PRV mediante qPCR-PRV. El Ct detectado indica replicación viral activa. Examen histológico pendiente.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 18 de Noviembre de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Pablo García/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		40/16 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		29.12.16	Fecha emisión del informe 13.01.17
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		1264	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV -Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie S. salar Peces silvestres
Condición de la muestra		Tº muestra: 10°C /Unidades refrigerantes: en descongelación	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	1 pool de órganos para PCR: bazo, corazón y branquias. 1 pool de órganos para histología: corazón y músculo.
Grupo (si aplica)	Lago Llanquihue	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 40/16	RT PCR PRV (L1)	L1-64 C- (**) C+PRV (**)	1	Ri., Ba., Bra., Co. (*)	28,98 NoCT 17,28	Positivo Negativo Positivo

Fecha de inicio ensayos: 29/12/2016  
METODOLOGÍA UTILIZADA: RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.  
Fecha término ensayos: 30/12/2016  
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica  
OBSERVACIONES:  
Riñón (Ri), Bazo (Ba), Branquia (Bra), Corazón (Co). (\*)  
Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (\*\*)  
El CT de corte para Fragmento L1 es correspondiente a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)  
EIF : CT 15,54

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 40/16	Corazón y músculo	Muestra individual

Fecha de inicio ensayos: Sin información  
Fecha término ensayos: 13.01.17  
Hallazgos y conclusiones: Hallazgos histológicos no corresponden a HSMI (Ver informe histológico que se adjunta).



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

La muestra de *Salmo trutta fario* no presentó material genómico de PRV, e histológicamente se describen alteraciones leves inespecíficas en epicardio y músculo esquelético. Las muestras de s. coho fueron positivas a PRV, sin embargo no se detectó HSMI en los órganos de estos peces.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 18 de Abril de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta amplificación de un segmento génico de Piscine reovirus (PRV), sin embargo el examen histológico realizado no revela cambios tisulares sugerentes de HSMI. Muestras de salmón del Atlántico positivas a PRV, negativas a HSMI.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
Jefe de Laboratorio  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Valdivia, 13 de Enero de 2016.

Versión: 03

Fecha: 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 005-17-E (CASO 40/16)  
FECHA: 13 de enero de 2017  
PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Salmón silvestre (*Salmo salar*)

**ANAMNESIS:** Se analizan las muestras enviadas desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática, en el marco del proyecto FIPA 2014-16.

Los tejidos enviados en formalina al 10% corresponden a corazón y músculo esquelético.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

Nº Caso Patología Acuática	Nº Caso Anatomía Patológica	Corazón	Páncreas
40/16	05-17-E	+ Infiltrado inflamatorio mononuclear en epicardio	S/A

+: Leve; ++: Moderado; +++: Marcado; ++++: Severo; S/A: sin alteraciones; N/O: no observado (órgano ausente).

**Corazón:** En la muestra fue posible observar epicarditis mononuclear difusa, en grado leve.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

**CONCLUSIÓN:** Los hallazgos observados en corazón corresponden principalmente a cambios inflamatorios de tipo mononuclear, leve. El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras.

**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		03/17 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		27.02.17	Fecha emisión del informe 18.04.17
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		1405	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV - Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie FA-32: <i>S. trutta fario</i> EV-05: <i>S. coho</i> PN-16: <i>S. coho</i>
Condición de la muestra		Tª muestra: 4ºC /Unidades refrigerantes: congeladas	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	3 pool de órganos para PCR: riñón, bazo, corazón y branquias. 3 pool de órganos para Histología: corazón y músculo esquelético.
Grupo (si aplica)	FA-32: Fiordo Aysén EV-05: Estuario Valdivia PN-16: Puerto Natales	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	26.01.17	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 03/17	RT PCR PRV (L1)	FA-32	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	No CT	Negativo
		EV-05	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	24,38	<b>Positivo</b>
		PM-16	1	Ri., Ba., Co., Bra. (*)	29,97	<b>Positivo</b>
		C- (**) C+PRV (**)			No CT 4,08	Negativo Positivo
Fecha de inicio ensayos: 07/03/2017					Fecha término ensayos: 09/03/2017	
<p>METODOLOGÍA UTILIZADA: RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.  <b>IMPORTANTE:</b> Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.            Nivel de incertidumbre asociada: No aplica  <b>OBSERVACIONES:</b>            Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Bra). (*)            Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (**)            El CT de corte para Fragmento L1 es correspondiente a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)            EIF: CT 21,25 – 29,02</p>						

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 03/17	Corazón y músculo	3 Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: Sin información		Fecha término ensayos: 17.04.17
Hallazgos y conclusiones: Ver en informe histológico que se adjunta		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

La muestra de *Salmo trutta fario* no presentó material genómico de PRV, e histológicamente se describen alteraciones leves inespecíficas en epicardio y músculo esquelético. Las muestras de s. coho fueron positivas a PRV, sin embargo no se detectó HSMI en los órganos de estos peces.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 18 de Abril de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 22-17-E a 24-17-E (CASO 03/17)

FECHA ENVÍO: 27 de febrero de 2017

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha fario (*Salmo trutta fario*)

**ANAMNESIS**

Se reciben 3 tubos (rotulados EV-05, PM-16 y FA-32) correspondientes al Caso 03/17, por parte del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón y músculo esquelético, fijados en formalina al 10% de dos especies: salmón coho y trucha fario.

Corresponden a muestras donde se sospecha de HSMI, Proyecto FIPA-2014-61.

Código de las muestras:

- Tubo EV-05: 22-17-E (salmón coho)
- Tubo PM-16: 23-17-E (salmón coho)
- Tubo FA-32: 24-17-E (trucha fario)

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

**22-17-E (Tubo EV-05, salmón coho)**

**Corazón:** Sin alteraciones.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

**23-17-E (Tubo PM-16, salmón coho)**

**Corazón:** Sin alteraciones.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

**24-17-E (Tubo FA-32, trucha fario)**

**Corazón:** Leve infiltrado inflamatorio difuso mononuclear en epicardio.

**Músculo esquelético:** Leve foco de infiltrado inflamatorio mononuclear en músculo rojo.

**DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS**

- Epicarditis mononuclear difusa, traza a leve.
- Miositis mononuclear focal, leve.

**CONCLUSIÓN**

Los hallazgos observados en corazón y músculo rojo de la muestra 24-17-E (Tubo FA-32, trucha fario) corresponden a cambios inflamatorios de tipo mononuclear, leves. El tipo de lesión observada, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras.

**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 17.04.17.-



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Pablo García/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		11/17 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		03.05.17	Fecha emisión del informe 10.07.17
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		1568	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV - Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie S. coho ( M8-43)
Condición de la muestra		Tº muestra: 2,3ºC /Unidades refrigerantes: congeladas	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	1 pool de órganos para PCR: riñón, bazo, corazón y branquias. 1 pool de órganos para Histología: corazón y músculo.
Grupo (si aplica)	Macrozona 8: Canal Puyuhuapi	Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	24.01.17	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 11/17	qPCR PRV	1 C- (**) C+ PRV (**) NTC	1	Ri., Ba., Co., Bra (*)	30,94 No CT 26,48 No CT	Positivo Negativo Positivo Negativo
Fecha de inicio ensayos: 15/05/2017					Fecha término ensayos: 17/05/2017	
<b>METODOLOGÍA UTILIZADA:</b> RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010. <b>IMPORTANTE:</b> Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas. Nivel de incertidumbre asociada: No aplica <b>OBSERVACIONES:</b> Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Bra). (*) Control negativo (C-) ( <i>Francisella</i> sp), Control positivo (C+) (PRV), Control sin templado (NTC). (**) El CT de corte para Fragmento L1 es corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas) ELF-1: 23,77						

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 11/17	Corazón y músculo	1pool de muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: Sin información		Fecha término ensayos: 21.06.17
Hallazgos y conclusiones: Ver en informe histológico que se adjunta		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Las muestras de salmón coho son positivas a PRV, sin embargo, el examen histológico no confirma HSMI en estas muestras.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 10 de Julio de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 149-17-E (CASO 11/17)

FECHA ENVÍO: 04 de mayo de 2017

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*)

#### ANAMNESIS

Se recibe 1 tubo (rotulado M8-43) correspondiente al Caso 11/17, por parte del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón y músculo esquelético, fijados en formalina al 10%. Corresponde a muestras donde se sospecha de HSMI. Proyecto FIPA-2014-61.

#### DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA

**Corazón:** Infiltrado inflamatorio con predominio mononuclear, leve, focal. Congestión en epicardio y miocardio, difusa, leve a moderada.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

#### DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS

- Epicarditis mononuclear focal, leve.

#### CONCLUSIÓN

Los hallazgos observados en corazón corresponden a cambios inflamatorios de tipo mononuclear y congestión. Las lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras.

**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 21.06.17.-



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		14/17 INFORME FINAL V00		
Fecha recepción de las muestras		05.06.17	Fecha emisión del informe	10.07.17
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO		
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		1665	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV -Histología		
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie	<i>O. mykiss</i> : EV: 90- 91-97-103 <i>O. kisutch</i> : PN 169
Condición de la muestra		Tº muestra: 3,9ºC /Unidades refrigerantes: congeladas		
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información		Nº de muestras/ peces	5 pool de órganos para PCR: riñón, bazo, corazón y branquias. 5 pool de órganos para Histología: corazón y músculo.
Grupo (si aplica)	EV: Estuario Valdivia PN: Puerto Natales		Lote (si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información		
Fecha del muestreo	EV:29.03.17 PN:05.04.17	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar	
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.				



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 14/17	qPCR PRV	EV-90	1	Ri., Ba., Co., Bra (*)	26,19	Positivo
		EV-91	1	Ri., Ba., Co., Bra (*)	32,16	Positivo
		EV-97	1	Ri., Ba., Co., Bra (*)	27,26	Positivo
		EV-103	1	Ri., Ba., Co., Bra (*)	21,11	Positivo
		PN169	1	Ri., Ba., Co., Bra (*)	29,92	Positivo
		C- (**)			No CT	Negativo
		C+ PRV (**)			28,87	Positivo
		NTC (**)			No CT	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 12/06/2017				Fecha término ensayos: 19/06/2017		
METODOLOGÍA UTILIZADA: RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co), Branquia (Bra). (*)						
Control negativo (C-) (Francisella SP), Control positivo (C+) (PRV), Control sin templado (NTC). (**)						
El CT de corte para Fragmento L1 es corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF-1: 24,93 a 29,96						

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 14/17	Corazón y músculo	5 Muestras individuales
Fecha de inicio ensayos: Sin información		Fecha término ensayos: 17.04.17
Hallazgos y conclusiones: Ver en informe histológico que se adjunta		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Las muestras de truchas arco iris y salmón coho son positivas a PRV, sin embargo, el tipo de lesión observada histológicamente, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI).

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 10 de Julio de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 239-17-E a 243-17-E (CASO 14/17)

FECHA ENVÍO: 06 de junio de 2017

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIES: Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha (*Oncorhynchus mykiss*)

#### ANAMNESIS

Se reciben 5 tubos (rotulados EV-90, EV-91, EV-97, EV-103 y PN-169) correspondientes al **Caso 14/17**, por parte del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Los tejidos enviados corresponden a secciones de corazón y músculo esquelético, fijados en formalina al 10% de dos especies: salmón coho y trucha arcoiris.

Corresponden a muestras donde se sospecha de HSMLI, Proyecto FIPA-2014-61.

Código de las muestras:

- Tubo EV-90: 239-17-E (trucha)
- Tubo EV-91: 240-17-E (trucha)
- Tubo EV-97: 241-17-E (trucha)
- Tubo EV-103: 242-17-E (trucha)
- Tubo PN-169: 243-17-E (salmón coho)

#### DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA

##### *239-17-E (Tubo EV-90, trucha arcoiris)*

**Corazón:** Epicarditis mononuclear leve, difusa. Congestión en epicardio, leve.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

##### *240-17-E (Tubo EV-91, trucha arcoiris)*

**Corazón:** Sin alteraciones.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

##### *241-17-E (Tubo EV-97, trucha arcoiris)*

**Corazón:** Sin alteraciones.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

##### *242-17-E (Tubo EV-103, trucha arcoiris)*

**Corazón:** Sin alteraciones.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

##### *243-17-E (Tubo PN-169, salmón coho)*

**Corazón:** Foco de infiltrado inflamatorio mononuclear, moderado, que infiltra el epicardio y el miocardio compacto. Degeneración de miocardiocitos, focal, leve. Congestión del miocardio compacto, leve.

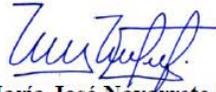
**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

**DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS**

- Epicarditis mononuclear difusa o focal, leve a moderada.

**CONCLUSIÓN**

Los hallazgos observados en corazón de las muestras 239-17-E (Tubo EV-90, trucha arcoiris) y 243-17-E (Tubo PN-169, salmón coho) corresponden a cambios inflamatorios de tipo mononuclear, leves a moderados. El tipo de lesión observada, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras.

**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 21.06.17.-

## Anexo 11: Casos Sospechosos de SAV



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Patricio Medina, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIPA 2014

Nº Caso	36/16 INFORME FINAL V00		
Fecha recepción de las muestras	20.12.16	Fecha emisión del informe	29.12.2016
Empresa	Servicio Nacional de Pesca / Oficina Puerto Montt		
Dirección	Victoria 2832, Valparaíso		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)	Sin información		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo	Sin información		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)	No adjunta guía de despacho	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	Formulario envío muestras a laboratorio de verificación S/Nº
Exámenes solicitados	PCR PD y Totivirus		
Tipo de muestra	Muestras de órganos PCR: corazón	Especie	<i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra	Tº muestras:18ºC / Unidades refrigerantes descongeladas		
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	1
Grupo (si aplica)	Código muestras :TVPD-1	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información		
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)	Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 36/16	RT PCR SAV	75714 C- (**) C+SAV(**)	5	Co (*)	No CT	Negativo Negativo Positivo
	RT PCR CMS	75714 C- (**) C+CMS(**)	5	Co (*)	No CT	Negativo Negativo Positivo

Fecha de inicio ensayos: 28/12/2016

Fecha término ensayos: 29/12/2016

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland y Endresen 2006.

RT PCR Tiempo Real PMCV, Haugland et al 2011

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**

Corazón (Co) (\*)

Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) (\*\*)

El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).

EIF: 30,99



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

El análisis mediante PCR para la detección de SAV y PMCV en las muestras que se indican resultó negativo sin CT.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 29 de Diciembre de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Patricio Medina, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIPA 2014

Nº Caso		37/16 PRE INFORME V01	
Fecha recepción de las muestras		22.12.16	Fecha emisión del informe 28.12.2016
Empresa		Servicio Nacional de Pesca/ Oficina Temuco	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		Sin información	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta guía de despacho	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) Formulario envío muestras a laboratorio de verificación S/Nº
Exámenes solicitados		PCR PD (SAV) – Histología - Secuenciación productos de PCR	
Tipo de muestra		Muestras de órganos PCR: corazón-branquias. Histología: corazón – ciegos pilóricos y músculo.	Especie <i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra		Tº muestras:17,8ºC / Unidades refrigerantes descongeladas	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	30
Grupo (si aplica)	Código muestras PBB: 12-13-14-15-16	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	20.12.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 37/16	RT PCR SAV (L1)	1	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		2	1	Br, Co. (*)	36,56	Negativo***
		3	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		4	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		5	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		6	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		7	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		8	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		9	1	Br, Co. (*)	35,19	Negativo***
		10	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		11	1	Br, Co. (*)	36,49	Negativo***
		12	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		13	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		14	1	Br, Co. (*)	37,04	Negativo***
		15	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		16	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		17	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		18	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		19	1	Br, Co. (*)	37,75	Negativo***
		20	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		21	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		22	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		23	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		24	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		25	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		26	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		27	1	Br, Co. (*)	34,80	Positivo***
		28	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		29	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		30	1	Br, Co. (*)	No CT	Negativo
		C- (**)			No CT	Negativo
		C+SAV(**)			13,32	Positivo

Fecha de inicio ensayos: 22/12/2016 Fecha término ensayos: 23/12/2016

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**  
RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland y col 2005.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**  
Branquia (Br), Corazón (Co). (\*)  
Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (\*\*)



El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).

EIF: CT 22,99 – 34,49

A las muestras marcadas (\*\*\*) se recomienda secuenciación.

BIOLOGIA MOLECULAR /SECUENCIACIÓN				
Identificación muestra (cliente )	Análisis	Nº pool	Secuencia obtenida.	Resultado BLAST NCBI
Caso 37/16	Secuenciación Productos PCR	2 Qnsp P-1F	GTGCACCAAGAGGCTCTCAGTATAGGACACACCTGGTCTATGCCGCAC TCTCAATGACTCGCTACATGCACTACATGTGGGGTGTCTTCACCT ATTTGGTCTCACACAGGCCACACTCACCCACTTGGCTACAAGCTA CCCTAATCGACCGTTTTGTAGACCACACAGTTCTCCATCTTGGTCAC AATGGTATGCCGTGCTTCTTCCCTGGAGCGGAACCGGGGGCCACAG AAGCCAGTGGGAGAGTAGGGCTTAGTCTGGGGTAGACTACGAGC ATCTGGAAAGAGCCTGGTCTCCAACTCATCGTTTTAGGGAGGAT CTTGGCCAGATGGCTTCACTAGCTTCTCCAACTTGACTACA	<i>Oncorhynchus mykiss</i> clone omyk-evn-514- 096 Hemoglobin subunit alpha-4 putative mRNA, complete cds
		2 Qnsp P-1R	GTTTGGAGGTAGGGCTGTGTCGGTCACTTTTCTTACATTGGTGGCTC TTTTGTGAATCTTTCAGGGCCGGGTCCGGCCGGCTGGCTGGTGGC CGCCCGGGCCGGGAGATCGCTGGTCTCGGCCGGAGGGCTAAJACCT TCATGAATCATATGGCTTGGAAATGGCCCATTTACGATCCATTGG TTTTTGTACCGATATCAATGAAGTCCGCCGCCAGCAACTGAGGGTGG ACCCACCAACTTCAAGATCCTGGCTCACAACTAATTGGTCAAT GGCGCTACTTCCCTGGGAAATTAACCCCGAGATTCACCTGTCCGT GGAGAGTTCCTGCAGCACTGGTTCAGGGCCGGA	<i>Oncorhynchus mykiss</i> clone omyk-evo-508- 026 Hemoglobin subunit alpha-4 putative mRNA, complete cds
		9 Qnsp P-1F	GGCTATGGTGTCTCCAGTTCGCCGTGTCGGGACTATGCCGCGC CTGACCTTCTCCCTCTTGTGCTACAGCATCATCCACTTGGCTCAAT TTTTCCCTTGGCTACAACTTCCATTTCTCCCGAACATGTCCCTTT AGCTGGCATAACAGACGGCTTCTCCCTCTTGGGTACATCTATCT ACATCCCCCATGGTATGGCTCTTTACAGTTAGTGGCTCCTATAG CTTCTCCCACTTGGCTACACTCAGGGCAGTGTGTATGCGGTGCTG TTGGATAGACACAGCCGGCAAGCTTTCGTTTTTGGGATGATCT GCTCTATATGGCCAGTCCCTCTCTAGCTCCAACTTTCTCACAT GTAGACACAAA	No significant similarity found
		9 Qnsp P-1R	CCGGCAGGTGGCGGAGTACTGCTGGTCCGCCCTCTCCCTGCCA CCTTGGCCGGTCTCGTGTCTGGGGGAGCATGAGGCTGATCTA TCTTGTCAAGCCCTGGTGTATCTCTTATTTCCCGTTTTATGTA CCTTTGTCTGGGAGTTATGGAGAGTCTACCTGCATTCAAGGGT GAGTACTATGCTCAACCCTCTGATGTAAAGGATAAAGTTGGAG AAGTGGTTCAGGGCCGGA	No significant similarity found
		11 Qnsp P-1F	GTTTGTACAGCTCCACAGCATATGCATTGTCCCTCCCTTACCTC CCCTCGTCTCCCTCTTGTACACAAACCATGCCGCCCAACTGG CCAGGTGGCTACAAACCGTAGGCAACATGGGGCACAACTGGTTC AGGGCCGTCCCACTTGGCTACAATTTTATGTAAAGCTATCCATCC TCTCTCCCTTGAAGTAACTCATCTGTATCGAACAGACTGGAC TACCATTGACAAATGTAGTAGTATAGTAAAGCAATAAGGCCAG AGGGAGCTTCTCCCACTTGGCTAC	No significant similarity found
		11 Qnsp P-1R	GAAGATATCGTTAGATCTTGCATGTGCTTATCCGACAGTGTGTTAC ATTTCCCTGCTTTTTTGGGCCGGAGCCGTGTCGAGGTGGTACTCT CGCTGTCAACTTCCCACTGGATCAGTCCGGAAATATTACATTC CAACTGGTTCAGGGCCGGA	No significant similarity found



		14 Qnsp P-1F	GTACCGTATGATATACGAGCGCTGCCGGGGCTTTACTCCTCCTGGCTA CAAGGAACAGCGCTGTTGAATCCATGTTACAAATCCTACATGATCAA TAACACACCCACACTCAACATACATCAGCTGTTAAJACAATCTCTT CCAGGCTCATCACACACTGCTATGATTTTTCCACACATTCACCTTT CCATACGTAAGCTTTCTCCACTTGCTACCATCTATCGTCTATCAT AGCTCTCCTCCACTTGCACTACCAAGCAGACTGACCGAGATTCCAA CAGAGAGACACACATACCGGCGTAAATGATGCAATTCATAT TTTCAATGAGCGCGCTTCACTGTGCCAAGGATTAGCATTCAATTA ATATAATTATCAACTGGTTCAGGGCCG	PREDICTED <i>Salmo salar</i> interferon-induced GTP-binding protein Mx-like (LOC106586887), Mrna
		14 Qnsp P-1R	GAGCCCGGGATTAGACTGTTCCCTTGCTATCTTCCCGGGTCCGACAG ATTCTGCACTGGTTCMAATCCCGGCTGACTTTGCCGGTCTCCGGCA GGTCTGTTTCACCGGCGGATGACACATAGAGCTTCTGAAACTGGA GGAGATGAGATAGAGCTGAGGAGGACCCAGGAGGGGATGAGTT ACTTGAGAACTGGTTCAGGGCCGGAACTATATATACATCTGACGGT TCAGCGCTGGTCTTACTTGTGATTTTTATACTTAATGACCTGCAC GAGGAGGACATTGCTACTGCCAAGTGGTTCAGGGCTCTTACCATA TTGCTGCTTTTGTATATGMAATGMAACGGGGTCCGGGG	No significant similarity found.
		19 Qnsp P-1F	GGTCACAGTGGTGCATGGATCCTGTGACGACTCCCATGCGCTGG TTGAGCACAGCTCCTGTTGGCTTCACTGAGTTCACGTAGCTTTTCAT TTCTTGGCTACAGAACAAATCCATTCTCCACTTGGCTACATGAG ATTTCTCCACATGCTTAGCAGATATTTTTTACAGCTTTCTCCAC TTGGCTACA	No significant similarity found.
		19 Qnsp P-1R	CGAACTGGATTTCATGCCATTGCTGACCTCACTTATTGATGTGTTATC TTAGTTTTTTGGTTTATGCTCATGGCCACTAGCCTAGTCAACAAT GGTTCTCGCCCGAGTCCGGAACTGGTTCAGGGCCGGACAAATGGA ATCTGCTATGCCAAGAAATACCACCTGGAGGAACTGGTTCAGGGCCG GA	No significant similarity found.
		27 Qnsp P-1F	CCCTCCTGGACTTGGCCGTTTGGAGGTTATTCTCCGGCTGTGATC CAGGCCGAGCTTGCTCCCACTTGCTACAGCAGCAGCTCCGACGCT TTCTCCACTTGGCTACAGGGTAGACATCACAGCTTTCTCCACTTG GCTACTCTGATCTGACACACACACACAGTACCTCCCTACATTCTGAT CTGACACACACACACACACACACAGTACCTCCCTACATTCTGATCT GACACACACACACACACACACACACAGTACCTCCATACTTTGTGATGTG AACACACACACACACACAGGTTATCTTTATTTCTAAATCCATGTAT CCCTCCAGAGCTCTCCCGGTGGACACA	No significant similarity found.
		27 Qnsp P-1R	NNNNN	No significant similarity found.
Fecha de inicio ensayos: 26/12/2016		Fecha término ensayos: 28/12/2016		
<p>METODOLOGÍA UTILIZADA: Secuenciación capilar de Sanger en instrumento ABI 3500 de Applied Biosystem, programa Sequencing Analysis. Empresa Austral-Omics</p> <p>OBSERVACIONES: Las muestras (6) fueron secuenciadas en sentido forward y reverse usando los primers Qnsp P-1F y Qnsp P-1R dando dos secuencias por muestra, en un total de 12 reacciones.</p>				



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Los resultados del examen histológico estarán listos la próxima semana.

En el caso de las muestras con resultado de Ct, se procedió a secuenciar los productos de PCR obtenidos. El resultado de la secuenciación y posterior análisis comparativo con otras secuencias, utilizando la herramienta Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), mostró que los productos de PCR amplificado por los partidores Qnsp P-1F y Qnsp P-1R, corresponden a parte de la secuencia génica de la "subunidad alfa de la hemoglobina" y "proteína tipo Mx" de trucha y salmón del Atlántico, respectivamente. Esta proteína tipo Mx es conservada en salmónidos. Lo anterior sugiere que es necesario revisar el uso de estos partidores para el diagnóstico de SAV en trucha arcoiris. Probablemente las muestras de trucha con más cantidad de sangre generen respuestas inespecíficas con estos partidores. En consecuencia los resultados son negativos para la presencia de SAV en las muestras analizadas.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 28 de diciembre de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Patricio Medina, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIPA 2014

Nº Caso	38/16 PRE INFORME V00		
Fecha recepción de las muestras	22.12.16	Fecha emisión del informe	29.12.2016
Empresa	Servicio Nacional de Pesca/ Oficina Temuco		
Dirección	Victoria 2832, Valparaíso		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)	Piscicultura Huililco		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo	90059		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)	001060	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	Formulario envío muestras a laboratorio de verificación S/Nº
Exámenes solicitados	PCR PD -Virología -Histología		
Tipo de muestra	Muestras de órganos PCR: riñón-bazo-corazón Histología: hígado-riñón-bazo- corazón – ciegos pilóricos y músculo. Virología: Riñón, bazo, corazón	Especie	<i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra	Tº muestras: 7,2ºC / Unidades refrigerantes congeladas		
Jaulas muestreadas (si aplica)	PBB: 12-13-14-15-16	Nº de muestras/ peces	24 Virología: 5 Histología: 5 PCR: 11
Grupo (si aplica)	Código muestras PBB: 12-13-14-15-16	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información		
Fecha del muestreo	26.12.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Al azar
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)	Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 38/16	RT PCR SAV	1	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		1	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		1	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		2	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		2	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		2	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		3	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		3	1	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		3	1	Ri.,Ba, Co. (*)	36,97	Negativo
		4	3	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		5	3	Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		C- (**)		Ri.,Ba, Co. (*)	No CT	Negativo
		C+SAV(**)		Ri.,Ba, Co. (*)	13,24	Positivo

Fecha de inicio ensayos: 28/12/2016 Fecha término ensayos: 29/12/2016  
**METODOLOGÍA UTILIZADA:**  
 RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland y Endresen 2006.  
**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
 Nivel de incertidumbre asociada: No aplica  
**OBSERVACIONES:**  
 Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co) (\*)  
 Control Positivo (C+), Control Negativo (C-) (\*\*)  
 El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).  
 EIF: 19,76 - 25,06

VIROLOGÍA					
Identificación muestra	Línea celular y Nº pasajes de la muestra	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados (Efecto citopático)	Confirmación por PCR
Caso 38/16 ( 5 pool)	CHSE 214 – SHK-1	3 peces	Riñón , bazo, corazón	-----	-----

Fecha de inicio ensayos: 28.12.16 Fecha término ensayos: Pendiente  
**METODOLOGÍA UTILIZADA:** cultivo celular 15°C  
**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
 Nivel de incertidumbre asociada: No aplica



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



HISTOLOGÍA		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 38/16 ( 5 pool)	hígado-riñón-bazo-corazón-ciegos pilóricos y músculo	3 peces
Fecha de inicio ensayos: 29.12.16		Fecha término ensayos: Pendiente
Hallazgos y conclusiones:		

**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Análisis PCR tiempo real para SAV negativos, cultivos celulares e histología pendientes.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 29 de Diciembre de 2016.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Patricio Medina, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIP 2014 - 61

Nº Caso		39A/16 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		28.12.16	Fecha emisión del informe 13.01.2017
Empresa		Servicio Nacional de Pesca/ Oficina Valdivia	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		Sin información	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) Formulario envío muestras al laboratorio de verificación S/Nº
Exámenes solicitados		PCR PD - Virología - Histología	
Tipo de muestra		Muestras de peces muertos	Especie <i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra		Tº muestras: 11°C / Unidades refrigerantes : Descongeladas	
Jaulas muestreadas (si aplica)	REC4- REC5 - REC6	Nº de muestras/ peces	30 peces 39 A1:10 peces 39 A2:10 peces 39 A3:10 peces
Grupo (si aplica)	Centro 1: R4-R5-R6	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	28.12.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados		
					CT	Interpretación	
Caso 39-A1	RT PCR SAV	1	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		1	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		1	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		1	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		1	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		2	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		2	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		2	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		2	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		2	1	Ri.,Ba., Co. (*)	No CT	Negativo	
		C- (**)				No CT	Negativo
		C+SAV(**)				12.01	Positivo

Fecha de inicio ensayos: 03/01/2017

Fecha término ensayos: 06/01/2017

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland 2006.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:

Riñón (Ri), Bazo (Ba), Corazón (Co). (\*)

Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (\*\*)

El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).

EIF: 22,30 - 25,48

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 39-A2	RT PCR SAV	3	5	Ri., Ba., Co. (*)	No CT	Negativo
		3	5	Ri., Ba., Co. (*)	No CT	Negativo
		C- (**)			No CT	Negativo
		C+SAV(**)			12.01	Positivo

Fecha de inicio ensayos: 03/01/2017

Fecha término ensayos: 05/01/2017

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland 2006.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



Riñón (Ri), Bazo (Br), Corazón (Co). (\*)  
Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (\*\*)  
El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).  
EIF: 22,25

VIROLOGÍA					
Identificación muestra	Línea celular y N° pasajes de la muestra	N° peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados (Efecto citopático)	Confirmación por PCR
39 A1		2 pool de 5 peces	Alevines completos		
39 A2		1 pool de 3 peces	Alevines completos		
Fecha de inicio ensayos: -----			Fecha término ensayos: -----		
METODOLOGÍA UTILIZADA: -----					
OBSERVACIONES: Muestras congeladas en espera de los resultados de PCR.					
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.					
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica					

NECROPSIA			
Identificación muestra (cliente)	39 A1: REC-B5:10 peces 39 A2: REC-B6:10 peces 39 A3: REC-B4:10 peces	Peso promedio:	
Fecha realización Necropsia	28.12.16	Rango:	Máximo Mínimo
Hallazgos examen externo	39 A1: deforme pedúnculo 1, piel oscura, aleta dorsal roída 4, pectoral 1, globo ocular dañado unilateral 2. 39 A2: deformes 3, 1 flaco, piel oscura, aletas roídas ápex dorsal, caudal 1, pectorales 3 39 A3: deformes 2, piel oscura, aletas roídas		
Hallazgos examen interno	39 A1: con grasa abdominal, estómago e intestino con alimento 39 A2: con grasa abdominal, hígado pálido 1, estómago e intestino con alimento 39 A3: con grasa abdominal, estómago e intestino con alimento, intestino sin alimento		
Conclusiones	Peces clínicamente sanos		



HISTOLOGÍA		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
39 A1	Corazón-músculo-ciegos pilóricos	2 pool de 5 peces
39 A2	Sin muestra	-----
39 A3	Sin muestra	-----
Fecha de inicio ensayos: Sin información		Fecha término ensayos: 13 .01.17
Hallazgos y conclusiones: Ver informe Histológico		

OPINIONES*, INTERPRETACIONES*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
(*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)
Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:
En corazón de los casos 39A1 1y 39A1 2 corresponden principalmente a cambios inflamatorios de tipo mononuclear, leve. Las lesiones pancreáticas observadas en todos los casos corresponden a atrofia y necrosis, lo que sería concordante con lesiones producidas en el caso de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN). El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Pancreas Disease (PD/SD). Los resultados de RT-PCR-SAV son negativos. Se descarta SAV en estas muestras.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
Jefe de Laboratorio  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Valdivia, 13 de Enero de 2017.

Versión: 03	Fecha : 21 de Enero de 2014
-------------	-----------------------------



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 01 a 02-17-E (CASO 39A1)

FECHA: 13 de enero de 2017

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Trucha (*Oncorhynchus mykiss*)

**ANAMNESIS:** Se analizan las muestras enviadas desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática, en el marco del proyecto FIPA 2014-16.

Los tejidos enviados en formalina al 10% son los siguientes:

Código de las muestras:

- **Caso 39A1:** 2 tubos rotulados 1 y 2. El tubo 1 contenía 4 corazones, 5 ciegos pilóricos y páncreas y 5 músculos esqueléticos. El tubo 2 contenía 1 muestra de corazón, 1 de ciegos pilóricos y páncreas y 1 de músculo esquelético.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

Nº Caso Patología Acuática	Nº Caso Anatomía Patológica	Corazón	Páncreas	Músculo esquelético	Otros
39A1 Tubo 1	01-17-E	+ Infiltrado inflamatorio mononuclear en epicardio	++ a +++ Atrofia de páncreas exocrino	S/A	
39A1 Tubo 1	01-17-E	S/A	++ a +++ Atrofia de páncreas exocrino	S/A	
39A1 Tubo 1	01-17-E	S/A	++ a +++ Atrofia de páncreas exocrino	S/A	
39A1 Tubo 1	01-17-E	S/A	++ a +++ Atrofia de páncreas exocrino	S/A	
39A1 Tubo 1	01-17-E	N/O	++ a +++ Atrofia de páncreas exocrino	S/A	
39A1 Tubo 2	02-17-E	+ Infiltrado inflamatorio mononuclear en epicardio	+ Necrosis +++ Atrofia de páncreas exocrino	S/A	

+: Leve; ++: Moderado; +++: Marcado; ++++: Severo; S/A: sin alteraciones; N/O: no observado (órgano ausente).

**CASO 01-17-E (Caso 39A1 Tubo 1)**

**Corazón:** En 1 de las 4 muestras fue posible observar epicarditis mononuclear difusa, en grado leve.

**Páncreas:** Todas las muestras presentaron moderada a marcada atrofia de páncreas exocrino.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

**CASO 02-17-E (Caso 39A1 Tubo 2)**

**Corazón:** La muestra presentó epicarditis mononuclear difusa, en grado leve.

**Páncreas:** La muestra presentó moderada atrofia y leve necrosis del páncreas exocrino, en ausencia de lesiones inflamatorias.

**Músculo esquelético:** Sin alteraciones.

**CONCLUSIÓN:**

Los hallazgos presentes en corazón de los casos 39A1 Tubo 1 y 39A1 Tubo 2 corresponden principalmente a cambios inflamatorios de tipo mononuclear, leve. Las lesiones pancreáticas observadas en todos los casos corresponden a atrofia y necrosis, lo que sería concordante con lesiones producidas en el caso de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN). El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Pancreas Disease (PD), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus en estas muestras.

**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Patricio Medina, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIPA 2014

Nº Caso		39 B/16 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		28.12.16	Fecha emisión del informe 13.01.2017
Empresa		Servicio Nacional de Pesca/ Oficina Valdivia	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		Sin información	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) Formulario envío muestras a laboratorio de verificación S/Nº
Exámenes solicitados		PCR SAV -Virología -Histología	
Tipo de muestra		Muestras de Peces vivos	Especie <i>O.mykiss</i>
Condición de la muestra		Peces vivos	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Batea 1, batea 4	Nº de muestras/ peces	60 Caso 39B1: Centro 2 R4/ 30 peces Caso 39B2: Centro 2 R1/ 30 peces
Grupo (si aplica)	Centro 2: R1- R4	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	28.12.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados		
					CT	CT (Repetición)	Interpretación
Caso 39-B1	RT PCR SAV	9	5	Alevin completo	36,97	No CT (**)	Negativo
		10	5	Alevin completo	No CT	-	Negativo
		11	5	Alevin completo	No CT	-	Negativo
		12	5	Alevin completo	No CT	-	Negativo
		13	5	Alevin completo	No CT	-	Negativo
		C- (*)			No CT	-	Positivo
		C+SAV(*)				14,88	-

Fecha de inicio ensayos: 29/12/2016

Fecha término ensayos: 30/12/2016

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland 2006.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:

Alevines completos macerados

Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (\*)

Repetición PCR muestra 9 (\*\*)

El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).

EIF: 23,45- 27,02

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 39-B2	RT PCR SAV	14	5	Alevin completo	No CT	Negativo
		15	5	Alevin completo	No CT	Negativo
		16	5	Alevin completo	No CT	Negativo
		17	5	Alevin completo	No CT	Negativo
		18	5	Alevin completo	No CT	Negativo
		C- (**)			No CT	Negativo
		C+SAV(**)				14,88

Fecha de inicio ensayos: 30/12/2016

Fecha término ensayos: 30/12/2016

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland 2006.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:



Alevines completos macerados  
Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (\*\*)  
El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).  
EIF: 24,91-25,19

VIROLOGÍA					
Identificación muestra	Línea celular y N° pasajes de la muestra	N° peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados (Efecto citopático)	Confirmación por PCR
Caso 39-B1		5	Alevines completos		
Caso 39-B2		5	Alevines completos		
Fecha de inicio ensayos: -----			Fecha término ensayos: -----		
METODOLOGÍA UTILIZADA:-----					
OBSERVACIONES: Muestras congeladas en espera de los resultados de PCR.					
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.					
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica					

NECROPSIA			
Identificación muestra (cliente)	Caso 39 B1: Centro 2 R4/ 30 peces Caso 39 B2: Centro 2 R1/ 30 peces	Peso promedio:	alevines
Fecha realización Necropsia	Caso 39B1: Centro 2 R4/ 30 peces Caso 39B2: Centro 2 R1/ 30 peces	Rango:	Máximo Mínimo-----
Hallazgos examen externo	Sin observaciones		
Hallazgos examen interno	Sin observaciones		
Conclusiones	Normalidad		



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



HISTOLOGÍA		
Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 39 B1	Alevines completos	5
Caso 39 B2	Alevines completos	3
Fecha de inicio ensayos: Sin información		Fecha término ensayos: 13.01.17
Hallazgos y conclusiones: Normalidad, sin sospecha de PD/SD		

OPINIONES*, INTERPRETACIONES*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
(*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)
Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:
Resultados de biología molecular, clínicos y en examen histológico no se observaron alteraciones en ninguno de los órganos analizados (corazón, páncreas, músculo esquelético, hígado) que hagan sospechar de la enfermedad Pancreas Disease (PD/SD).

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
Jefe de Laboratorio  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Valdivia, 13 de enero de 2017.

Versión: 03	Fecha : 21 de Enero de 2014
-------------	-----------------------------



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 03 a 04-17-E (CASOS 39B1 y 39B2)

FECHA: 13 de enero de 2017

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Trucha (*Oncorhynchus mykiss*)

**ANAMNESIS:** Se analizan las muestras enviadas desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática, en el marco del proyecto FIPA 2014-16.

Los tejidos enviados en formalina al 10% son los siguientes:

Código de las muestras:

- Caso 39B1: 1 tubo con 3 alevines completos.
- Caso 39B2: 1 tubo con 5 alevines completos.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

N° Caso Patología Acuática	N° Caso Anatomía Patológica	Corazón	Páncreas	Músculo esquelético	Otros
39 B1 Alevín 1	03-17-E	S/A	S/A	S/A	
39 B1 Alevín 2	04-17-E	S/A	S/A	S/A	
39 B1 Alevín 3	04-17-E	S/A	S/A	S/A	+++ Esteatosis hepática
39 B2 Alevín 1	05-17-E	S/A	S/A	S/A	
39 B2 Alevín 2	05-17-E	S/A	S/A	S/A	
39 B2 Alevín 3	05-17-E	S/A	S/A	S/A	
39 B2 Alevín 4	05-17-E	S/A	S/A	S/A	
39 B2 Alevín 5	05-17-E	S/A	S/A	S/A	

+: Leve; ++: Moderado; +++: Marcado; ++++: Severo; S/A: sin alteraciones; N/O: no observado (órgano ausente).

**CASO 03-17-E (Caso 39B1 Alevines 1 a 3)**

**Corazón:** No se observaron alteraciones en los alevines analizados.

**Páncreas:** No se observaron alteraciones en los alevines analizados.

**Músculo esquelético:** No se observaron alteraciones en los alevines analizados.

**Hígado:** Uno de los alevines presentó una esteatosis microvesicular marcada.

**CASO 04-17-E (Caso 39B2 Alevines 1 a 5)**

**Corazón:** No se observaron alteraciones en los alevines analizados.

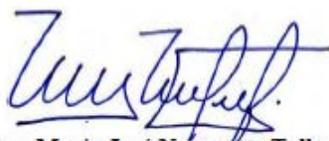
**Páncreas:** No se observaron alteraciones en los alevines analizados.

**Músculo esquelético:** No se observaron alteraciones en los alevines analizados.

**CONCLUSIÓN:**

La esteatosis hepática observada en el caso 39 B1 Alevín 3 se asocia a períodos de inanición, los que llevan a una movilización de nutrientes.

No se observaron alteraciones en ninguno de los órganos analizados que hagan sospechar de la enfermedad Pancreas Disease (PD), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus en estas muestras.



**Dra. María José Navarrete Talloni**  
M.V., M.P.V.M., Ph.D.  
Laboratorio de Anatomía Patológica  
Instituto de Patología Animal  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Patricio Medina, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIPA 2014

Nº Caso		41/16 PRE INFORME V00	
Fecha recepción de las muestras		29.12.16	Fecha emisión del informe 09.01.2017
Empresa		Servicio Nacional de Pesca	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) Formulario envío muestras a laboratorio de verificación S/Nº
Exámenes solicitados		PCR PD/SD	
Tipo de muestra		15 tubos con muestras de órganos en etanol 15 tubos con alevines completos en Etanol	Especie <i>O.mykiss</i>
Condición de la muestra		Tº muestras: / Unidades refrigerantes	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Alevines completos:MAT1-E3 Muestras de órganos: Recría 1	Nº de muestras/ peces	15 tubos con muestras de órganos: corazón y branquias en etanol. 15 tubos con alevines completos en Etanol.
Grupo (si aplica)		Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	27.12.16	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)						
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación
Caso 41/16	RT PCR SAV	10830	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10832	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10833	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10834	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10835	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10836	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10837	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10838	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10839	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10841	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10842	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10844	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10845	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10806	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		10783	1	Br., Co. (*)	No CT	Negativo
		C- (**)			No CT	Negativo
C+SAV(**)			12.01	Positivo		

Fecha de inicio ensayos: 04/01/2017 Fecha término ensayos: 05/01/2017

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**  
RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland 2006.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**  
Branquia (Br), Corazón (Co). (\*)  
Control Positivo (C+), Control Negativo (C-). (\*\*)  
El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas).  
EIF: 22,31 - 27,57  
Las muestras del anexo A no fueron analizadas pues corresponden a alevines enteros sin cola en etanol.



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

No se detectó amplificación específica del segmento génico RNA de SAV por RT qPCR.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 09 de Enero de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Patricio Medina, Servicio Nacional de Pesca/Proyecto FIPA 2014

Nº Caso		01/17 INFORME FINAL V00		
Fecha recepción de las muestras		12.01.17	Fecha emisión del informe	18.01.2017
Empresa		Servicio Nacional de Pesca/Oficina VIII Región		
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso		
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Sin información		
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica		
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		No adjunta	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica)	Formulario envío muestras a laboratorio de verificación S/Nº
Exámenes solicitados		RT PCR SAV		
Tipo de muestra		30 tubos con muestras de órganos en RNA Later	Especie	<i>O. mykiss</i>
Condición de la muestra		Tº muestras: 9,3 / Unidades refrigerantes: Descongeladas		
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	30 tubos con muestras de órganos: corazón y branquias RNA Later	
Grupo (si aplica)	Código muestras : TR HUI 08-16	Lote (si aplica)	Sin información	
Muestreo realizado por (si aplica)	Sin información			
Fecha del muestreo	11.01.17	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información	
Condiciones ambientales al muestreo (si aplica)		Sin información		
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.				



RESULTADOS DE ENSAYOS								
BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)								
Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados			
					CT	Interpretación		
Caso 01/17	RT PCR SAV	1	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		2	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		3	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		4	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		5	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		6	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		7	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		8	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		9	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		10	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		11	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		12	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		13	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		14	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		15	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		16	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		17	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		18	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		19	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		20	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		21	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		22	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		23	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		24	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		25	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		26	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		27	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		28	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		29	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
		30	1	Co., Bra. (*)	No CT	Negativo		
				C- (**)				Negativo
				C+SAV(**)				Positivo

Fecha de inicio ensayos: 16/01/2017 Fecha término ensayos: 18/01/2017

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**  
RT PCR Tiempo Real SAV, Hodneland & Endresen 2006.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**  
Branquia (Bra), Corazón (Co). (\*)  
Control Positivo (+), Control Negativo (-). (\*\*)  
El CT de corte corresponde a 35 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas). EIF: 22,17 - 31,52



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

No se detectó amplificación específica del segmento génico RNA de SAV por RT qPCR. Llama la atención que la muestra no incluye riñón, y si incorpora branquias.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 18 de Enero de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014

## Anexo 12: Casos Branquias NGD Trucha



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Servicio Nacional de Pesca

Nº Caso		15/17 PRE INFORME V00	
Fecha recepción de las muestras		12.06.17	Fecha emisión del informe 29.06.2017
Empresa		Servicio Nacional de Pesca	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Piscicultura Curacalco	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		90084	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		16455	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR AMEBAS-Histología	
Tipo de muestra		Muestras de Branquias en RNA Later, Etanol y Formalina	Especie Trucha
Condición de la muestra		-----	
Jaulas muestreadas (si aplica)	SC09	Nº de muestras/ peces	10
Grupo (si aplica)	----	Lote(si aplica)	TNAQCH16ENCR
Muestreo realizado por (si aplica)		Dr. Ricardo Enríquez	
Fecha del muestreo	09.06.17	Tipo de muestreo (si aplica)	Muestreo al azar
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición Pool (órganos)	Secuenciación	Resultados
Caso 15/17	PCR AMEBAS	5	2 peces por pool	Branquias	No aplica	Pendiente
	PCR AMEBAS	5	2 peces por pool	Branquias	No aplica	Pendiente

Fecha de inicio ensayos: Sin información  
Fecha término ensayos: Pendiente  
METODOLOGÍA UTILIZADA: En desarrollo  
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.  
Nivel de incertidumbre asociada:

**NECROPSIA**

Identificación muestra (cliente)	16/17	Peso promedio:	Sin información
Fecha realización Necropsia	09.06.17	Rango:-----	Máximo :---- Mínimo :----
Hallazgos examen externo	Aletas dorsal ápex roído leve Branquias: áreas blanquecinas en la mayoría de los arcos branquiales.		
Hallazgos examen interno	Estómago e intestino con alimento, sin alteraciones internas.		
Conclusiones	Lesiones branquiales sugerentes de amebiasis.		

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 15/16	branquias	5 tubos de 2 peces por pool

Fecha de inicio ensayos: 13.06.17  
Fecha término ensayos: 29.06.17  
Hallazgos y conclusiones: Ver Informe Histológico



Universidad Austral de Chile

Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Diagnóstico histológico: Branquitis hiperplásica

CONCLUSIÓN: Las lesiones encontradas en las branquias concuerdan con lo observado en casos de amebiasis, sin embargo, no se encontraron amebas en las muestras analizadas.

Biología molecular pendiente de desarrollo de PCR.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 29 de Junio de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA - CHILE

CASO N°: 260 al 264-17-E  
FECHA: 29 de junio de 2017  
PATÓLOGO: Dr. Enrique Paredes H.

PROPIETARIO :  
DIRECCIÓN :  
SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros – Laboratorio de Biotecnología y Pat. Acuát.  
FECHA DE EXAMEN: 13 de junio de 2017  
ESPECIE: Trucha PESO:  
RAZA: COLOR:  
SEXO: CASO: 15/17  
EDAD:

**ANAMNESIS:** Sin antecedentes. Se solicita describir lesiones y detectar amebas.

**Muestras:** Se reciben cinco tubos rotulados, conteniendo cada uno formalina y branquias.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA:**

Identificación del caso	Branquia
260-17-E (PC A1)	<u>Laminillas 2arias:</u> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión + Congestión ++ <u>Laminillas 1arias:</u> En ápex hiperplasia células epiteliales +++ hiperplasia células mucosas ++ Inf. Inflam. ++
261-17-E (PC A2)	<u>Laminillas 2arias:</u> Hiperplasia de células epiteliales +++ con fusión +++ Congestión +++ Hemorragia +
262-17-E (PC A3)	<u>Laminillas 2arias:</u> Hiperplasia multifocal de células epiteliales +++ con fusión + Telangiectasias (+) Congestión ++ Hiperplasia multifocal de células mucosas +++ Mucus ++ <u>Laminillas 1arias:</u> En ápex y en el eje hiperplasia células epiteliales +++ Hiperplasia células mucosas ++ e Inf. Inflam. ++
263-17-E (PC A4-5-6-7-8)	<u>Laminillas 2arias:</u> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión ++ Hiperplasia de células mucosas + Telangiectasias ++ (una muestra) Congestión ++ Hemorragia ++ (dos muestras) <u>Laminillas 1arias:</u> En ápex hiperplasia células epiteliales ++ e Inf. Inflam. +
264-17-E (PC A9-10-11-12-13)	<u>Laminillas 2arias:</u> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión ++ Congestión ++ Hiperplasia de células mucosas ++ <u>Laminillas 1arias:</u> En ápex hiperplasia células epiteliales +++ e Inf. Inflam. ++)

**DIAGNÓSTICO:** Branquitis hiperplásica

**CONCLUSIÓN:** Las lesiones encontradas en las branquias concuerdan con lo observado en casos de amebiasis, sin embargo, no se encontraron amebas en las muestras analizadas.

Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
JEFE DE SERVICIO

Servicio de Anatomía Patológica  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile



**INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO**  
(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Servicio Nacional de Pesca

Nº Caso		16 /17 PRE INFORME V00	
Fecha recepción de las muestras		12.06.17	Fecha emisión del informe 29.06.2017
Empresa		Servicio Nacional de Pesca	
Dirección		Victoria 2832, Valparaíso	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		Piscicultura Estero Matanza	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		90096	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		15880	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR Amebas-Histología	
Tipo de muestra		16A: Sin muestras 16B: Muestras de Branquias en RNA Later, Etanol y Formalina	Especie Trucha
Condición de la muestra		-----	
Jaulas muestreadas (si aplica)	16A: Estanques 418-422 16B: E431-432	Nº de muestras/ peces	16A: 15 16B: 10
Grupo (si aplica)	16A: 16B:	Lote(si aplica)	16A: TNAQ16NHEM 16B.TNHT16CHCRDBBSEM
Muestreo realizado por (si aplica)		Dr. Ricardo Enríquez	
Fecha del muestreo	9.06.17	Tipo de muestreo (si aplica)	16A: Muestreo al azar 16B: Muestreo dirigido
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Secuenciación	Resultados
Caso 16/17	PCR AMEBAS	5	2 peces por pool	Branquias	No aplica	Pendiente
	PCR AMEBAS	5	2 peces por pool	Branquias	No aplica	Pendiente
Fecha de inicio ensayos: Sin información				Fecha término ensayos: Pendiente		
METODOLOGÍA UTILIZADA: Em desarrollo						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada:						

**NECROPSIA**

Identificación muestra (cliente)	16A: TNAQ16NHEM 16B: TNHT16CHCRDBBSEM	Peso promedio:	Sin información
Fecha realización Necropsia	09.06.17	Rango:-----	Máximo :----- Mínimo :-----
Hallazgos examen externo	16A: branquias normales 16B: branquias con áreas leves de decoloración		
Hallazgos examen interno	16A: sin observación 16B: estómago / intestino con alimento		
Conclusiones	16A: sin evidencia clínica de lesión branquial 16B: lesiones branquiales que sugieren amebiasis, internamente sin alteraciones		

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 16/16	branquias	5 tubos de 2 peces por pool
Fecha de inicio ensayos: 13.06.17		Fecha término ensayos: 29.06.17
Hallazgos y conclusiones: Ver Informe Histológico		



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Las truchas del grupo TNAQ16NHEM muestreadas al azar no mostraron lesiones branquiales sugerentes de amebiasis. Las truchas del grupo TNHT16CHCRDBBSEM si mostraron áreas de decoloración branquial. El diagnóstico histológico describe una bronquitis hiperplásica. Las lesiones encontradas en las branquias concuerdan con lo observado en casos de amebiasis, sin embargo, no se encontraron amebas en las muestras analizadas. Por otra parte, la presencia de trastornos circulatorios como telangiectasias, trombos y hemorragias encontrados en algunas muestras no corresponden a la acción de amebas, sino que se relacionan con condiciones desfavorables del agua y a veces asociados a microorganismos oportunistas.  
Resultado molecular pendiente de desarrollo de PCR.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 29 de junio de 2017.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL**  
 FONOS FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA - CHILE

**CASO N°:** 268 al 272-17-E  
**FECHA:** 29 de junio de 2017  
**PATÓLOGO:** Dr. Enrique Paredes H.

**PROPIETARIO :**  
**DIRECCIÓN :**  
**SOLICITADO POR:** Dra. Vania Quinteros – Laboratorio de Biotecnología y Pat. Acuát.  
**FECHA DE EXAMEN:** 13 de junio de 2017

---

**ESPECIE:** Trucha **PESO:**  
**RAZA:** **COLOR:**  
**SEXO:** **CASO:** 16/17  
**EDAD:**

**ANAMNESIS:** Sin antecedentes. Se solicita describir lesiones y detectar amebas.

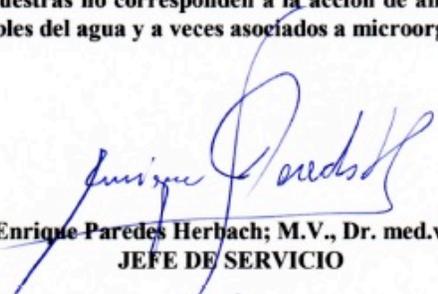
**Muestras:** Se reciben cinco tubos rotulados, conteniendo cada uno formalina y branquias.

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA:**

Identificación del caso	Branquia
268-17-E (PM1)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia epitelial de células epiteliales + Hiperplasia multifocal de células mucosas + Congestión ++ Telanglectasias ++ Hemorragias + <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales ++ hiperplasia células mucosas ++ Inf. Inflam. +
268-17-E (PM1)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ Hiperplasia multifocal de células mucosas ++ Congestión ++ <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales ++ hiperplasia células mucosas ++ Inf. Inflam. ++ desde la base comprometiendo el eje y en parte el ápex
269-17-E (PM2)	Sin alteraciones
269-17-E (PM2)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión ++ y formación de pequeñas cavidades ++ Hiperplasia multifocal de células mucosas ++ Congestión ++ <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales + hiperplasia células mucosas ++ Inf. Inflam. +
270-17-E (PM3)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión + Hiperplasia multifocal de células mucosas ++ Congestión ++ Trombos ++ Telanglectasias +++ Hemorragias ++ <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales + hiperplasia células mucosas ++ Inf. Inflam. ++
270-17-E (PM3)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión ++ Hiperplasia multifocal de células mucosas ++ Congestión ++ Trombos + Telanglectasias ++ Hemorragias + <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales +++ hiperplasia células mucosas ++ Inf. Inflam. ++
271-17-E (PM4)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión + Hiperplasia multifocal de células mucosas + Congestión + Hemorragias + <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales ++ hiperplasia células mucosas ++ Inf. Inflam. +
271-17-E (PM4)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión + Hiperplasia multifocal de células mucosas + Congestión + <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales + hiperplasia células mucosas + Inf. Inflam. +
272-17-E (PM5)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales ++ con fusión + Hiperplasia de células mucosas + Trombosis + Congestión + Hemorragia + <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales ++ e Inf. Inflam. + el cual compromete parcialmente la base + y el eje +
272-17-E (PM5)	<b>Laminillas 2arias:</b> Hiperplasia multifocal de células epiteliales + Congestión + Hemorragia (+) <b>Laminillas 1arias:</b> En ápex hiperplasia células epiteliales + Hiperplasia de células mucosas + e Inf. Inflam. +

**DIAGNÓSTICO:** Branquitis hiperplásica

**CONCLUSIÓN:** Las lesiones encontradas en las branquias concuerdan con lo observado en casos de amebiasis, sin embargo, no se encontraron amebas en las muestras analizadas. Por otra parte, la presencia de trastornos circulatorios como telangiectasias, trombos y hemorragias encontrados en algunas muestras no corresponden a la acción de amebas, sino que se relacionan con condiciones desfavorables del agua y a veces asociados a microorganismos oportunistas.

  
Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
**JEFE DE SERVICIO**

Servicio de Anatomía Patológica  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Austral de Chile

### Anexo 13: Casos PRV AGUA DULCE

CÓDIGO MUESTRA	Nº CASO
141010543	020/14

### RESULTADOS RT PCR-PRV REGIÓN DE LOS RIOS

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 20/14	RT PCR PRV	29	Individual	Corazón / Riñón	32,27	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	30	Individual	Corazón / Riñón	27,18	<b>Positivo</b>
141010543		31	Individual	Corazón / Riñón	28,41	<b>Positivo</b>
		32	Individual	Corazón / Riñón	27,95	<b>Positivo</b>
		33	Individual	Corazón / Riñón	30,49	<b>Positivo</b>
		34	Individual	Corazón / Riñón	30,18	<b>Positivo</b>
		35	Individual	Corazón / Riñón	28,64	<b>Positivo</b>
		36	Individual	Corazón / Riñón	28,7	<b>Positivo</b>
		37	Individual	Corazón / Riñón	29,45	<b>Positivo</b>
		38	Individual	Corazón / Riñón	27,82	<b>Positivo</b>
		39	Individual	Corazón / Riñón	29,92	<b>Positivo</b>
		40	Individual	Corazón / Riñón	30,27	<b>Positivo</b>
		41	3/pool	Corazón / Riñón	24,78	<b>Positivo</b>
		42	3/pool	Corazón / Riñón	25,13	<b>Positivo</b>

Fecha de inicio ensayos: 22/4/14

Fecha término ensayos: 23/4/14

#### METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

#### OBSERVACIONES:

\*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: Rango de CT 18,2 – 19,95

**RESULTADOS RT PCR-PRV REGIÓN DEL MAULE**

<b>CÓDIGO MUESTRA</b>	<b>Nº CASO</b>
7102-0021	010/14

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 10/14	RT PCR PRV	1(C1)	Individual	Corazón / Riñón	29,24	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2(C2)	Individual	Corazón / Riñón	23,03	<b>Positivo</b>
7102-0021		3(C3)	Individual	Corazón / Riñón	29,41	<b>Positivo</b>
		4(C4)	Individual	Corazón / Riñón	30,52	<b>Positivo</b>
		5(C5)	Individual	Corazón / Riñón	30,75	<b>Positivo</b>
		6(D1)	Individual	Corazón / Riñón	30,65	<b>Positivo</b>
		7(D2)	Individual	Corazón / Riñón	26,39	<b>Positivo</b>
		8(D3)	Individual	Corazón / Riñón	29,18	<b>Positivo</b>
		9(D4)	Individual	Corazón / Riñón	28,83	<b>Positivo</b>
		10(D5)	Individual	Corazón / Riñón	31,45	<b>Positivo</b>
		11(E1)	Individual	Corazón / Riñón	29,86	<b>Positivo</b>
		12(E2)	Individual	Corazón / Riñón	29,78	<b>Positivo</b>
		13(E3)	3/pool	Corazón / Riñón	28,76	<b>Positivo</b>
		14(E4)	3/pool	Corazón / Riñón	24,56	<b>Positivo</b>

Fecha de inicio ensayos: 9/4/14

Fecha término ensayos: 9/4/14

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:

\*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: Rango de CT 18,76 – 20,84

**RESULTADOS RT PCR-PRV REGIÓN DEL BÍO BÍO**

CÓDIGO MUESTRA	Nº CASO
8110-0107	034/14

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 34/14	RT PCR PRV	1(E6)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2(E7)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
8110-0107		3(E15)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		4(E16)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		5(E20)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		6(E21)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		7(E22)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		8(E23)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		9(E24)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		10(E38)	Individual	Corazón / Riñón	35,01	Negativo
		11(E39)	Individual	Corazón / Riñón	35,01	Negativo
		12(E40)	Individual	Corazón / Riñón	35,01	Negativo
		13(E5)	3/pool	Corazón / Riñón	30,95	<b>Positivo</b>
		14(E37)	3/pool	Corazón / Riñón	32,94	<b>Positivo</b>

Fecha de inicio ensayos: 6/5/14

Fecha término ensayos: 7/5/14

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**

\*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: Rango de CT 18,17 – 20,59

**RESULTADOS RT PCR-PRV REGIÓN ARAUCANIA**

<b>CÓDIGO MUESTRA</b>	<b>Nº CASO</b>
9101-0109	017/14
9101-0098	023/14
9101-0085	026/14
9101-0121	027/14
9101-0124	028/14
9101-0118	031/14
9101-0128	032/14
9101-0142	036/14
9101-0147	037/14
9101-0091	045/14
9101-0134	055/14
9101-0096	056/14

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 17/14	RT PCR PRV	1(A)	Individual	Corazón / Riñón	35,52	Negativo
Código:	(L1)	2(B)	Individual	Corazón / Riñón	35,52	Negativo
9101-0109		3(C)	Individual	Corazón / Riñón	35,52	Negativo
		4(D)	Individual	Corazón / Riñón	31,01	<b>Positivo</b>
		5(E)	Individual	Corazón / Riñón	33,7	<b>Positivo</b>
		6(F)	Individual	Corazón / Riñón	34,48	Negativo
		7(G)	Individual	Corazón / Riñón	34,03	Negativo
		8(H)	Individual	Corazón / Riñón	34,03	Negativo
		9(I)	Individual	Corazón / Riñón	34,03	Negativo
		10(J)	Individual	Corazón / Riñón	32,91	<b>Positivo</b>
		11(K)	Individual	Corazón / Riñón	31,96	<b>Positivo</b>
		12(L)	Individual	Corazón / Riñón	31,63	<b>Positivo</b>
		13(M)	3/pool	Corazón / Riñón	26,31	<b>Positivo</b>
		14(N)	3/pool	Corazón / Riñón	32,25	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 21/4/14					Fecha término ensayos: 21/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 19,04 – 23,57						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 23/14	RT PCR PRV	1a	Individual	Corazón / Riñón	36,36	Negativo
Código:	(L1)	2b	Individual	Corazón / Riñón	38,94	Negativo
9101-0098		3c	Individual	Corazón / Riñón	23,71	<b>Positivo</b>
		4d	Individual	Corazón / Riñón	23,97	<b>Positivo</b>
		5e	Individual	Corazón / Riñón	23,08	<b>Positivo</b>
		6f	Individual	Corazón / Riñón	32,16	<b>Positivo</b>
		7g	Individual	Corazón / Riñón	22,3	<b>Positivo</b>
		8h	Individual	Corazón / Riñón	22,04	<b>Positivo</b>
		9i	Individual	Corazón / Riñón	23,61	<b>Positivo</b>
		10j	Individual	Corazón / Riñón	28,19	<b>Positivo</b>
		11k	Individual	Corazón / Riñón	27,86	<b>Positivo</b>
		12l	Individual	Corazón / Riñón	28,52	<b>Positivo</b>
		13m	3/pool	Corazón / Riñón	25,8	<b>Positivo</b>
		14n	3/pool	Corazón / Riñón	25,72	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 24/4/14					Fecha término ensayos: 25/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 15,71 – 17,95						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 26/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	29,7	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	30,02	<b>Positivo</b>
9101-0085		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	31,43	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	31,27	<b>Positivo</b>
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	32,22	<b>Positivo</b>
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	31,1	<b>Positivo</b>
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	33,12	<b>Positivo</b>
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	32,44	<b>Positivo</b>
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	29,29	<b>Positivo</b>
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	26,36	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	27,64	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	24,61	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	29,61	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	32,19	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 25/4/14					Fecha término ensayos: 28/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 18,39 – 20,44						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 27/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	31,97	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	32,57	<b>Positivo</b>
9101-0121		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	29,29	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	29,94	<b>Positivo</b>
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	27,74	<b>Positivo</b>
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	30,62	<b>Positivo</b>
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	32,22	<b>Positivo</b>
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	31,93	<b>Positivo</b>
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	33,23	<b>Positivo</b>
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	31,6	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	31,67	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	32,93	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	30,92	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	30,68	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 28/4/14					Fecha término ensayos: 29/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 19,36 – 21,35						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 28/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	36,91	Negativo
9101-0124		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	28,94	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	38,43	Negativo
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	38,43	Negativo
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	38,43	Negativo
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	23,1	<b>Positivo</b>
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	31,78	<b>Positivo</b>
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	21,97	<b>Positivo</b>
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	22,59	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	23,67	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	22,93	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	26,34	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	20,46	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 28/4/14					Fecha término ensayos: 29/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 19,02 – 21,94						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 31/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
9101-0118		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	25,17	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	29,13	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	29,64	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	30,93	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	28,66	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 5/5/14			Fecha término ensayos: 5/5/14			
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 17,2 – 18,95						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 32/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	20,96	<b>Positivo</b>
9101-0128		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	32,09	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	36,55	Negativo
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	36,55	Negativo
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	36,55	Negativo
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	26,25	<b>Positivo</b>
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	36,89	Negativo
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	37,95	Negativo
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	37,64	Negativo
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	22,9	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	33,72	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	35,99	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 5/5/14					Fecha término ensayos: 5/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 17,16 – 18,33						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 36/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	25,3	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	23,59	<b>Positivo</b>
9101-0142		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	28,11	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	24,9	<b>Positivo</b>
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	24,75	<b>Positivo</b>
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	22,99	<b>Positivo</b>
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	24,07	<b>Positivo</b>
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	30,25	<b>Positivo</b>
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	24,94	<b>Positivo</b>
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	27,46	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	22,97	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	23,63	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	23,87	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	25,37	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 7/5/14					Fecha término ensayos: 7/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 18,22 – 20,45						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 37/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	32,01	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	30,04	<b>Positivo</b>
9101-0147		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	32,1	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	31,93	<b>Positivo</b>
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	32,36	<b>Positivo</b>
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	32,2	<b>Positivo</b>
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	33,79	<b>Positivo</b>
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	31,83	<b>Positivo</b>
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	36,97	Negativo
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	33,7	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	31,38	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	32,85	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	30,93	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	31,09	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 7/5/14					Fecha término ensayos: 7/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 18,44 – 20,97						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 45/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	38,42	Negativo
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	38,42	Negativo
9101-0091		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	38,42	Negativo
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	38,93	Negativo
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	38,59	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 12/5/14					Fecha término ensayos: 12/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 18,96 – 20,19						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 55/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	21,91	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	23,36	<b>Positivo</b>
9101-0134		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	22,9	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	22,55	<b>Positivo</b>
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	25,85	<b>Positivo</b>
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	23,19	<b>Positivo</b>
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	27,43	<b>Positivo</b>
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	21,82	<b>Positivo</b>
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	23,96	<b>Positivo</b>
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	22,83	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	21,75	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	23,97	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	20,99	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	25,72	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 2/6/14					Fecha término ensayos: 2/6/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 17,97 – 19,7						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 56/14	RT PCR PRV	1(a)	Individual	Corazón / Riñón	32,85	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2(b)	Individual	Corazón / Riñón	34,39	Negativo
9101-0096		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	32,07	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	32,55	<b>Positivo</b>
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	35,52	Negativo
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	34,61	Negativo
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	32,44	<b>Positivo</b>
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	35,61	Negativo
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	33,9	<b>Positivo</b>
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	33,52	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	33,1	<b>Positivo</b>
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	32,94	<b>Positivo</b>
		13(m)	3/pool	Corazón / Riñón	32,35	<b>Positivo</b>
		14(n)	3/pool	Corazón / Riñón	34,82	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 3/6/14					Fecha término ensayos: 3/6/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 18,33 – 19,44						

**RESULTADOS RT PCR-PRV DÉCIMA REGIÓN (Puerto Montt)**

<b>CÓDIGO MUESTRA</b>	<b>Nº CASO</b>
1010113868	013/14
101014204	014/14
101014051	015/14
101010330	029/14
101014142	030/14
101014055	042/14
101011937	048/14
101010147	051/14
101014078	053/14
101013957	057/14

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 13/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
1010113868		3	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		4	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		6	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		7	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		11	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		14	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 14/4/14					Fecha término ensayos: 15/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 16,95 – 19,41						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 14/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	31,04	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	31,23	<b>Positivo</b>
101014204		3	Individual	Corazón / Riñón	31,63	<b>Positivo</b>
		4	Individual	Corazón / Riñón	34,72	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	31,85	<b>Positivo</b>
		6	Individual	Corazón / Riñón	30,27	<b>Positivo</b>
		7	Individual	Corazón / Riñón	31,56	<b>Positivo</b>
		8	Individual	Corazón / Riñón	32,79	<b>Positivo</b>
		9	Individual	Corazón / Riñón	31,33	<b>Positivo</b>
		10	Individual	Corazón / Riñón	29,93	<b>Positivo</b>
		11	Individual	Corazón / Riñón	31,18	<b>Positivo</b>
		12	Individual	Corazón / Riñón	35,97	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	31,41	<b>Positivo</b>
		14	3/pool	Corazón / Riñón	30,8	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 15/4/14					Fecha término ensayos: 16/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 15,52 – 18,09						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 15/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	31,57	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	26,11	<b>Positivo</b>
101014051		3	Individual	Corazón / Riñón	30,89	<b>Positivo</b>
		4	Individual	Corazón / Riñón	28,74	<b>Positivo</b>
		5	Individual	Corazón / Riñón	27,17	<b>Positivo</b>
		6	Individual	Corazón / Riñón	29,26	<b>Positivo</b>
		7	Individual	Corazón / Riñón	32,5	<b>Positivo</b>
		8	Individual	Corazón / Riñón	31,38	<b>Positivo</b>
		9	Individual	Corazón / Riñón	31,94	<b>Positivo</b>
		10	Individual	Corazón / Riñón	31,78	<b>Positivo</b>
		11	Individual	Corazón / Riñón	30,51	<b>Positivo</b>
		12	Individual	Corazón / Riñón	31,24	<b>Positivo</b>
		13	3/pool	Corazón / Riñón	30,43	<b>Positivo</b>
		14	3/pool	Corazón / Riñón	33,12	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 15/4/14					Fecha término ensayos: 16/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 16,06 – 18,91						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 29/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	32,3	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	30,54	<b>Positivo</b>
101010330		3	Individual	Corazón / Riñón	32,18	<b>Positivo</b>
		4	Individual	Corazón / Riñón	33,4	<b>Positivo</b>
		5	Individual	Corazón / Riñón	30,85	<b>Positivo</b>
		6	Individual	Corazón / Riñón	32,62	<b>Positivo</b>
		7	Individual	Corazón / Riñón	31,91	<b>Positivo</b>
		8	Individual	Corazón / Riñón	28,92	<b>Positivo</b>
		9	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	28,96	<b>Positivo</b>
		11	Individual	Corazón / Riñón	29,36	<b>Positivo</b>
		12	Individual	Corazón / Riñón	32,93	<b>Positivo</b>
		13	3/pool	Corazón / Riñón	32,61	<b>Positivo</b>
		14	3/pool	Corazón / Riñón	26,61	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 29/4/14					Fecha término ensayos: 30/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 19,01 – 20,99						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 30/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
101014142		3	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		4	Individual	Corazón / Riñón	36,91	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	36,91	Negativo
		6	Individual	Corazón / Riñón	36,91	Negativo
		7	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		11	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		14	3/pool	Corazón / Riñón	36,87	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 29/4/14					Fecha término ensayos: 30/4/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 16,36 – 17,71						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 42/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	22,23	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	22,86	<b>Positivo</b>
101014055		3	Individual	Corazón / Riñón	24,09	<b>Positivo</b>
		4	Individual	Corazón / Riñón	27,43	<b>Positivo</b>
		5	Individual	Corazón / Riñón	22,92	<b>Positivo</b>
		6	Individual	Corazón / Riñón	22,98	<b>Positivo</b>
		7	Individual	Corazón / Riñón	37,38	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	37,38	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	37,38	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	37,07	Negativo
		11	Individual	Corazón / Riñón	37,07	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	37,07	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	25,41	Positivo
		14	3/pool	Corazón / Riñón	38,93	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 9/5/14					Fecha término ensayos: 9/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 19,89 – 22,15						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 48/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
101011937		3	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		4	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		6	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		7	Individual	Corazón / Riñón	36,83	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	36,83	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	36,83	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		11	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		14	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 27/5/14					Fecha término ensayos: 29/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 17,57 – 21,91						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 51/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	25,92	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	29,58	<b>Positivo</b>
101010147		3	Individual	Corazón / Riñón	26,84	<b>Positivo</b>
		4	Individual	Corazón / Riñón	25,69	<b>Positivo</b>
		5	Individual	Corazón / Riñón	34,03	Negativo
		6	Individual	Corazón / Riñón	24,88	<b>Positivo</b>
		7	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	26,71	<b>Positivo</b>
		9	Individual	Corazón / Riñón	25,21	<b>Positivo</b>
		10	Individual	Corazón / Riñón	26,54	<b>Positivo</b>
		11	Individual	Corazón / Riñón	24,25	<b>Positivo</b>
		12	Individual	Corazón / Riñón	30,36	<b>Positivo</b>
		13	3/pool	Corazón / Riñón	27,55	<b>Positivo</b>
		14	3/pool	Corazón / Riñón	28,21	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 28/5/14					Fecha término ensayos: 30/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 17,96 – 19,01						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 53/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	34,99	Negativo
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	34,99	Negativo
101014078		3	Individual	Corazón / Riñón	34,99	Negativo
		4	Individual	Corazón / Riñón	35,74	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	35,74	Negativo
		6	Individual	Corazón / Riñón	35,74	Negativo
		7	Individual	Corazón / Riñón	34,01	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	34,01	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	34,01	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		11	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	27	<b>Positivo</b>
		14	3/pool	Corazón / Riñón	23,76	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 29/5/14					Fecha término ensayos: 30/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 16,45 – 18,16						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 57/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	35,17	Negativo
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	34,17	Negativo
101013957		3	Individual	Corazón / Riñón	34,98	Negativo
		4	Individual	Corazón / Riñón	34,66	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	33,13	<b>Positivo</b>
		6	Individual	Corazón / Riñón	37,66	Negativo
		7	Individual	Corazón / Riñón	33,49	<b>Positivo</b>
		8	Individual	Corazón / Riñón	35,44	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	34,5	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	33,79	<b>Positivo</b>
		11	Individual	Corazón / Riñón	34,33	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	34,95	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	32,91	<b>Positivo</b>
		14	3/pool	Corazón / Riñón	31,35	<b>Positivo</b>
Fecha de inicio ensayos: 3/6/14					Fecha término ensayos: 3/6/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 16,94 – 20,26						

**RESULTADOS RT PCR-PRV DÉCIMA REGIÓN (Castro)**

<b>CÓDIGO MUESTRA</b>	<b>Nº CASO</b>
101012744	043/14
101010675	041/14
101010594	046/14

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 43/14	RT PCR PRV	1(a)	3/pool	Corazón / Riñón	36,93	Negativo
Código:	(L1)	2(b)	3/pool	Corazón / Riñón	25,98	<b>Positivo</b>
101012744		3(c)	Individual	Corazón / Riñón	27,54	<b>Positivo</b>
		4(d)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		5(e)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		6(f)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		7(g)	Individual	Corazón / Riñón	34,13	Negativo
		8(h)	Individual	Corazón / Riñón	34,13	Negativo
		9(i)	Individual	Corazón / Riñón	34,13	Negativo
		10(j)	Individual	Corazón / Riñón	31,51	<b>Positivo</b>
		11(k)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12(l)	Individual	Corazón / Riñón	29,3	<b>Positivo</b>
		13(m)	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		14(n)	Individual	Corazón / Riñón	36,89	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 9/5/14					Fecha término ensayos: 9/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 19,51 – 20,92						

Identificación (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 41/14	RT PCR PRV	1	3/pool	Corazón /	22,25	<b>Positivo</b>
Código:	(L1)	2	3/pool	Corazón /	27,81	<b>Positivo</b>
101010675		3	Individual	Riñón	22,91	<b>Positivo</b>
		4	Individual	Corazón /	23,75	<b>Positivo</b>
		5	Individual	Riñón	34,55	Negativo
		6	Individual	Corazón /	27,51	<b>Positivo</b>
		7	Individual	Riñón	23,94	<b>Positivo</b>
		8	Individual	Corazón /	22,73	<b>Positivo</b>
		9	Individual	Riñón	23,25	<b>Positivo</b>
		10	Individual	Corazón /	22,68	<b>Positivo</b>
		11	Individual	Riñón	34,7	Negativo
		12	Individual	Corazón /	21,19	<b>Positivo</b>
		13	Individual	Riñón	21,23	<b>Positivo</b>
		14	Individual	Corazón /	24,17	<b>Positivo</b>
				Riñón		
Fecha de inicio ensayos: 8/5/14					Fecha término ensayos: 8/5/14	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 18,02 - 19,95						

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 46/14	RT PCR PRV	1	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
101010594		3	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		4	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		6	Individual	Corazón / Riñón	36,99	Negativo
		7	Individual	Corazón / Riñón	36,99	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	36,99	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		11	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		13	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		14	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Fecha de inicio ensayos: 26/5/14					Fecha término ensayos:	
METODOLOGÍA UTILIZADA:						
RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.						
IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.						
Nivel de incertidumbre asociada: No aplica						
OBSERVACIONES:						
*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)						
ELF: Rango de CT 18,47 – 21,33						

**RESULTADOS RT PCR-PRV REGIÓN DE AYSÉN**

CÓDIGO MUESTRA	Nº CASO
11201-0869-1 al 14	033/14

Identificación (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 33/14	RT PCR PRV	1	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
Código:	(L1)	2	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
11201-0869		3	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		4	Individual	Corazón / Riñón	36,98	Negativo
		5	Individual	Corazón / Riñón	36,98	Negativo
		6	Individual	Corazón / Riñón	36,98	Negativo
		7	Individual	Corazón / Riñón	38,96	Negativo
		8	Individual	Corazón / Riñón	38,96	Negativo
		9	Individual	Corazón / Riñón	38,96	Negativo
		10	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		11	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		12	Individual	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		13	3/pool	Corazón / Riñón	No CT	Negativo
		14	3/pool	Corazón /	No CT	Negativo

Fecha de inicio ensayos: 5/5/14

Fecha término ensayos: 5/5/14

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**

\*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: Rango de CT 17,83 – 25,96

- **Examen Histopatológico**

Se examinaron muestras de corazón y músculo esquelético de los s. Atlánticos que resultaron positivos mediante RT PCR-PRV con CT inferiores o iguales a 30. Se presentan en las tablas siguientes los datos de las muestras analizadas.

**Identificación de muestras**

Nº Caso Patología Animal	Nº Caso Ictiopatología	Nº Muestra	Rótulo tubo	REGIÓN	Código muestras
					SERNAPESCA
484-14-E	Caso 10/14	2	C2	Region del Maule	7102-0021
485-14-E	Caso 10/14	7	D2		
486-14-E	Caso 14/14	1	1	Décima región (Pto	101014204
487-14-E	Caso 14/14	10	10		
488-14-E	Caso 15/14	2	2	Décima región (Pto	101014051
490-14-E	Caso 20/14	2	30F	Los Ríos	141010543
491-14-E	Caso 23/14	3	c	Novena Región	9101-0098
492-14-E	Caso 23/14	7	g		
493-14-E	Caso 23/14	8	h		
494-14-E	Caso 26/14	12	L	Novena Región	9101-0085
495-14-E	Caso 32/14	2	b	Novena Región	9101-0128
496-14-E	Caso 36/14	11	k	Novena Región	9101-0142
498-14-E	Caso 41/14	12	12	Décima Región (Castro)	101010675
499-14-E	Caso 42/14	2	2	Décima región (Pto Montt)	101014055
504-14-E	Caso 55/14	1	a	Novena Región	9101-0134
505-14-E	Caso 55/14	10	j		

<b>DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA</b>							
Nº Caso Patología Animal	Músculo Esquelético		Corazón			Páncreas	Riñón
	Degeneración	Infiltración macrofágica	Epicarditis		Miocarditis		
484-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	+ Degeneración	+ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares + Degeneración tubular
485-14-E	S/A	S/A	++		S/A	N/O	++ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares + Degeneración tubular
486-14-E	S/A	S/A	+		S/A	S/A	S/A
487-14-E	S/A	S/A	S/A		++ Inflamación en zona límite con capa esponjosa ++ Degeneración de miocitos	S/A	S/A
488-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	S/A	+ Degeneración tubular
490-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	S/A	+ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares
491-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	+ Degeneración y necrosis	+ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares + Degeneración tubular
492-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	S/A	+ Degeneración tubular
493-14-E	S/A	S/A	+		S/A	+ Degeneración y necrosis	+ Degeneración tubular
494-14-E	S/A	S/A	S/A		+ Multifocal, capa esponjosa	S/A	S/A
495-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	+ Degeneración	S/A
496-14-E	S/A	S/A	++		+ Difusa	S/A	+ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares.
498-14-E	S/A	S/A	+ Difusa		++ Difusa	S/A	+ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares
499-14-E	S/A	S/A	+ Difusa		++ Difusa	S/A	+ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares
504-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	S/A	++ Celularidad hematopoyética con predominio de células inflamatorias mononucleares.
505-14-E	S/A	S/A	S/A		S/A	S/A	S/A

+: Leve, ++: Moderado, +++: Marcado, ++++: Severo, S/A: sin alteraciones, N/O: no observado (muestra ausente).

## Anexo 14: PRV salmónidos silvestres

Se incluyen los informes de caso 01/15, 04/15 y 26/15 de muestras de salmónidos silvestres colectadas por el IFOP. Se indican los resultados de RT PCR-PRV y de examen histológico de corazón de los peces muestreados.

### INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO

(R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		01/15 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		05.02.15	Fecha emisión del informe 07.05.2015
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O`Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		Nº Guía despacho 16934	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV –Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>S. salar</i> Peces silvestres Lago Llanquihue-contramuestra
Condición de la muestra		Sin información	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	1 pool de órganos para PCR 1 órgano (corazón) para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			

**RESULTADOS DE ENSAYOS****BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 01/15 (L1-34)	RT PCR PRV (L1)	L1 34	Sin información	Sin información	24,4	Positivo

Fecha de inicio ensayos: 27/03/2015

Fecha término ensayos: 15/04/2015

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**

\*El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: CT 34,9

Valor CT ELF elevado (&gt;24) puede indicar descomposición de la muestra o que ésta no corresponde a salmón del Atlántico.

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 01/15 L134	Corazón (1)	1

Fecha de inicio ensayos:

Término ensayos:

Hallazgos y conclusiones: en informe adjunto

**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

**Bases documentales** que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta reacción genómica del fragmento L1 de PRV, nivel de CT indica resultado positivo. Muestra histológica (solo corazón) detecta infiltración compatible con HSMI a nivel de pericardio y endocardio, sin embargo además describe área de necrosis que no es compatible con HSMI. Como no se incluye muestra de musculatura esquelética no es posible definir caso de HSMI.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS

Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 07 de 05 de 2014.



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
 INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
 FONOS FAX 63-221424 CASILLA 567 VALDIVIA CHILE

	CASO N°:	135-15-E
	FECHA:	29 de abril de 2015
	PATÓLOGO:	Dra. María José Navarrete Talloni.
ENVIADO POR :	DR. VANIA QUINTEROS (BIOTECNOLOGÍA Y PATOLOGÍA ACUÁTICA, UACH)	
FECHA DE EXAMEN:	24 de ABRIL de 2015	
ESPECIE:	Salmo salar	

**ANAMNESIS:** Se recibe una muestra de corazón, correspondiente al caso 01/15, rotulada como L134. Se solicita detectar infiltración linfocitaria y se indica sospecha de HSMI.

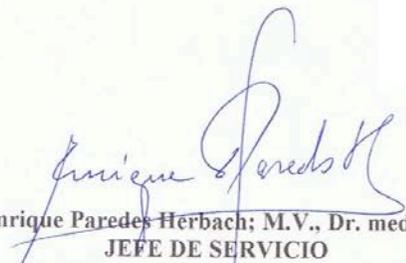
**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA:**

**Corazón:** Se observa un moderado infiltrado inflamatorio mononuclear, predominantemente linfocitario en epicardio, difuso. A nivel del miocardio compacto y esponjoso se observa un leve infiltrado mononuclear con predominio linfocitario, distribuido difusamente y en el miocardio esponjoso también se observan focos pequeños. Un sector del miocardio presenta un área de necrosis leve, con detritus celular, acumulación de material proteico con pérdida de la arquitectura normal del órgano.

**CONCLUSIÓN:** En la muestra se observaron lesiones inflamatorias infiltrativas las que son indicativas de un proceso infeccioso de carácter agudo. Las lesiones inflamatorias observadas en miocardio y epicardio podrían ser indicativas de un proceso de origen viral, cuya causa más probable es Piscine reovirus (PRV).

Al respecto de la lesión necrótica observada en miocardio, no es una lesión característica de HSMI.

Probablemente se trata de un cuadro de HSMI incipiente, pero el diagnóstico definitivo debe ser complementado con un análisis histopatológico de músculo rojo.

  
 Enrique Paredes Herbach; M.V., Dr. med.vet.  
 JEFE DE SERVICIO

Servicio de Anatomía Patológica  
 Facultad de Ciencias Veterinarias  
 Universidad Austral de Chile



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero. Por Proyecto FIP 2014-61.

Nº Caso		04/15 INFORME FINAL V00	
Fecha recepción de las muestras		21.04.15	Fecha emisión del informe 29.10.2015
Empresa INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO			
Dirección Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt			
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		Nº Guía despacho 17134	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados PCR PRV - Histología			
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie <i>S. salar</i> (x5)=L15 -17-20-21-22-24. <i>O. kisutch</i> (x6)=L16 -04;L15 -01-02-03-12-30. <i>O. mykiss</i> (x1)=L15 -16.
Condición de la muestra		Tª muestra 5,5 °C/ Unidades refrigerantes : En descongelación	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	12 pool de órganos para PCR 12 pool órganos para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica) Sin información			
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



### RESULTADOS DE ENSAYOS

#### BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 04/15	RT PCR PRV (L1)	L16-04	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	33,23	Positivo
		L15-01	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	34,61	Negativo
		L15-02	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	34,59	Negativo
		L15-03	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	26,87	Positivo
		L15-12	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	31,49	Positivo
		L15-16	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	No CT	Negativo
		L15-17	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	30,25	Positivo
		L15-20	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	35,06	Negativo
		L15-21	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	22,91	Positivo
		L15-22	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	32,04	Positivo
		L15-24	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	32,69	Positivo
		L15-30	Individual	Ri, Ba, Bra, Co (*)	37,99	Negativo

Fecha de inicio ensayos: 30/09/15

Fecha término ensayos: 07/10/15

METODOLOGÍA UTILIZADA:

RT PCR Tiempo Real HSM1 Fragmento L1, Palacios 2010.

IMPORTANTE: Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

OBSERVACIONES:

\*Riñón (Ri), Bazo (Ba), Branquia (Bra) y Corazón (Co).

El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas)

ELF: Rango de CT 26,3-27,2 (Podría indicar muestras en regular estado)

#### HISTOLOGÍA

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 04/15	Corazón	1

Fecha de inicio ensayos: Sin información      Término ensayos: 29.10.15  
Hallazgos y conclusiones: Ver informe histológico (Se adjunta)



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta mediante RT-PCR PRV positividad en 3 muestras de salmón coho y 4 de salmón del Atlántico. Negatividad con nivel de CT 2 muestras de salmón coho y 2 de salmón del Atlántico. La muestra de trucha arcoíris resultó negativa sin CT. Histológicamente los hallazgos observados en tejido cardíaco no son los clásicos asociados a HSMI. No es posible definir HSMI sino se incluye en las muestras correspondientes tejido muscular para el examen histológico.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**

Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Biotecnología  
y Patología Acuática  
Universidad Austral de Chile



Valdivia, 29 de Octubre de 2015.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 154 a 165-15-E (CASO 04/15)  
FECHA: 29 de octubre de 2015  
PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: Salmón Atlántico (*Salmo salar*)

**ANAMNESIS:** Se analizan 7 muestras de corazón, correspondientes al Caso 04/15, enviadas en el marco del proyecto FIP, desde el Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Los tejidos corresponden a secciones de corazón, fijados en formalina al 10%. Las muestras enviadas presentaron PCR positivas para virus PRV.

Código de las muestras:

- L16-04: 154-15-E
- L15-12: 157-15-E
- L15-17: 159-15-E
- L15-21: 161-15-E
- L15-22: 162-15-E
- L15-24: 163-15-E
- L15-03: 165-15-E

**DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA**

N° Caso Anatomía Patológica	Código muestras	Corazón				
		Epicarditis mononuclear	Miocarditis mononuclear capa compacta	Miocarditis mononuclear capa esponjosa	Congestión	Otros
154-15-E	L16-04	S/A	S/A	S/A	S/A	
157-15-E	L15-12	S/A	S/A	+ difusa	S/A	
159-15-E	L15-17	+	+	+	S/A	
161-15-E	L15-21	+	+	+	S/A	2 focos inflamación mononuclear + en atrio
162-15-E	L15-22	S/A	S/A	S/A	S/A	
163-15-E	L15-24	+	+	+	S/A	
165-15-E	L15-03	+	S/A	S/A	+ en epicardio	

+: Leve; ++: Moderado; +++: Marcado; ++++: Severo; S/A: sin alteraciones; N/O: no observado (órgano ausente).

**Corazón:** En 4 de las 7 muestras fue posible observar epicarditis mononuclear difusa, en grado leve. Además, se observó en el miocardio de algunas de las muestras, un infiltrado mononuclear difuso, leve. Este infiltrado inflamatorio abarcaba la capa compacta y/o la capa esponjosa, en grado leve. En uno de los casos (muestra 161-15-E) se observaron también dos focos pequeños de células mononucleares en el atrio. Sólo se observó congestión en el epicardio de una de las muestras (165-15-E), distribuido de manera difusa y de severidad leve.

**CONCLUSIÓN:** Los hallazgos observados en corazón corresponden principalmente a cambios inflamatorios de tipo mononuclear, leve. El tipo de lesiones observadas, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras o que estos animales se encuentren en una fase inicial de la enfermedad, cuando aún no es posible observar las lesiones más generalizadas y de mayor intensidad.

Se recomienda la observación conjunta de corazón y músculo esquelético, lo que facilita un diagnóstico histopatológico más completo, especialmente frente a la sospecha de casos clínicos de HSMI.



**Dra. María José Navarrete Talloni**

M.V., M.P.V.M., Ph.D.

Laboratorio de Anatomía Patológica

Instituto de Patología Animal

Universidad Austral de Chile



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



## INFORME DE RESULTADOS DE ENSAYO (R-PRE-002)

Estimado Señor(a): Juan Carlos Quintanilla/ Instituto de Fomento Pesquero

Nº Caso		26/15 INFORME FINAL V01	
Fecha recepción de las muestras		01.10.15	Fecha emisión del informe 10.11.2015
Empresa		INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO	
Dirección		Calle Bernardo O'Higgins 246, Puerto Montt	
Centro o lugar del muestreo (si aplica)		No aplica	
Código SIEP Piscicultura /Centro (si aplica)/ Código Laboratorio que subcontrata ensayo		No aplica	
Nº de Orden de compra/ Nº Guía de Despacho /Otro documento (si aplica)		Nº Guía despacho	Nº Planilla envío muestra empresa (si aplica) No aplica
Exámenes solicitados		PCR PRV - Histología	
Tipo de muestra		pool de órganos en alcohol 96% y formalina 10%	Especie  <i>S. salar</i> (x7) L15: -64, -107. L11: -140,-152,-154. L1: -122. L9: -91 <i>O. kisutch</i> (x1) L15: -11 <i>O. mykiss</i> (x1) L5: -156
Condición de la muestra		Tª muestra °C/ Unidades refrigerantes : En descongelación	
Jaulas muestreadas (si aplica)	Sin información	Nº de muestras/ peces	9 pool de órganos para PCR 9 tubos órganos para Histología
Grupo (si aplica)	Sin información	Lote(si aplica)	Sin información
Muestreo realizado por (si aplica)		Sin información	
Fecha del muestreo	Sin información	Tipo de muestreo (si aplica)	Sin información
Condiciones ambientales al muestreo(si aplica)		Sin información	
El procedimiento de muestreo utilizado (oficial) corresponde al que se encuentra establecido en la Norma Técnica de SERNAPESCA LABD/NT1 de Agosto de 2011 y NT2 de Febrero de 2010.			



**RESULTADOS DE ENSAYOS**

**BIOLOGÍA MOLECULAR (PCR)**

Identificación muestra (cliente)	Análisis	Nº pool	Nº peces/pool	Composición pool (órganos)	Resultados	
					CT	Interpretación*
Caso 26/15	RT PCR PRV (L1)	L1-122	Individual	Ri, Bra, Co (*)	31,9	Positivo
		L5-156	Individual	Ri, Bra, Co (*)	29,6	Positivo
		L9-91	Individual	Ri, Bra, Co (*)	34,6	Negativo
		L11-140	Individual	Ri, Bra, Co (*)	33,5	Positivo
		L11-152	Individual	Ri, Bra, Co (*)	30,5	Positivo
		L11-154	Individual	Ri, Bra, Co (*)	31,8	Positivo
		L15-11	Individual	Ri, Bra, Co (*)	No CT	Negativo
		L15-64	Individual	Ri, Bra, Co (*)	28,9	Positivo
L15-107	Individual	Ri, Bra, Co (*)	33,9	Positivo		

Fecha de inicio ensayos: 19/10/15

Fecha término ensayos: 19/10/15

**METODOLOGÍA UTILIZADA:**

RT PCR Tiempo Real HSMI Fragmento L1, Palacios 2010.

**IMPORTANTE:** Los resultados obtenidos solo tienen validez para las muestras analizadas.

Nivel de incertidumbre asociada: No aplica

**OBSERVACIONES:**

\*Riñón (Ri), Branquia (Bra) y Corazón (Co).

El Ct de corte para Fragmento L1 corresponde a 33 (muestras sobre este CT serán dadas como negativas

ELF: Rango de CT 22,0 - 30,6 (Podría indicar muestras en regular estado)

**HISTOLOGÍA**

Identificación muestra	Composición pool (órganos)	Nº peces u órganos/pool
Caso 026/15	corazón	1

Fecha de inicio ensayos: Sin información      Término ensayos: 04.11.15  
Hallazgos y conclusiones: Ver informe Histológico (Se adjunta)



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



**OPINIONES\*, INTERPRETACIONES\*, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

(\*Aplica cuando se hacen interpretaciones de resultados, pueden estar basadas en publicaciones científicas o en la experiencia del laboratorio, en ambos casos debe explicarse el respaldo de la interpretación)

Bases documentales que respaldan estas opiniones e interpretaciones:

Se detecta mediante RT PCR-PRV positividad en 6 muestras de salmón del Atlántico y en la muestra de trucha arcoíris. Negatividad con CT en 1 muestra de salmón del Atlántico. La muestra de salmón coho resultó negativa sin CT. Histológicamente los hallazgos observados en tejido cardíaco no son los clásicos asociados a HSMI. No es posible definir HSMI sino se incluye en las muestras correspondientes tejido muscular para el examen histológico.

Con atentos saludos,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

Valdivia, 10 de Noviembre de 2015.

Versión: 03

Fecha : 21 de Enero de 2014



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL  
FONO: 63-221424 VALDIVIA - CHILE

CASOS PANI: 588-15-E, 589-15-E, 590-15-E,  
591-15-E, 592-15-E, 593-15-E, 594-15-E  
y 601-15-E (CASO 26/15)

FECHA ENVÍO: 1 de octubre de 2015 / 7 de octubre 2015

PATÓLOGO: Dra. María José Navarrete T.

SOLICITADO POR: Dra. Vania Quinteros, Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática.

ESPECIE: *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss*

**ANAMNESIS:** Se reciben 9 tubos correspondientes al Caso 26/15, por parte del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática. Los tejidos enviados pertenecen a muestras sospechosas de HSMI, Proyecto FIP-2015 y corresponden a secciones de corazón, fijados en formalina al 10%.

Las muestras analizadas en este informe presentaron PCR positivas para virus PRV.

Código de las muestras:

- L15-64 (*S. salar*) : 588-15-E
- L15-107 (*S. salar*) : 589-15-E
- L15-122 (*S. salar*) : 590-15-E
- L15-140 (*S. salar*) : 592-15-E
- L15-152 (*S. salar*) : 593-15-E
- L15-154 (*S. salar*) : 594-15-E
- L5-156 (*O. mykiss*): 601-15-E

#### DESCRIPCIÓN HISTOPATOLÓGICA

**Corazón:** Sólo se observaron lesiones en 1 de las 6 muestras (588-15-E, L15-64), donde fue posible observar una epicarditis mononuclear difusa, en grado leve, presentando la infiltración de células de tipo mononuclear, individuales, distribuidas a lo largo de todo el epicardio, agrupándose en ciertas áreas.

**CONCLUSIÓN:** El hallazgo observado en corazón de la muestra 588-15-E (L15-64) corresponde a un cambio inflamatorio de tipo mononuclear, leve. El tipo de lesión observada, su magnitud y distribución no corresponden a los hallazgos clásicos observados en la enfermedad Inflamación del Músculo Esquelético y Cardíaco (HSMI), lo que no excluye la posibilidad de la presencia de ADN del virus PRV en estas muestras.

Se recomienda la observación conjunta de corazón y músculo esquelético para realizar un diagnóstico histopatológico más completo frente a la sospecha de casos clínicos de HSMI.

Dra. María José Navarrete Talloni  
M.V., M.P.V.M., Ph.D.  
Laboratorio de Anatomía Patológica  
Instituto de Patología Animal  
Universidad Austral de Chile

Fecha informe: 04.11.15.-

## Anexo 15: Encuestas Técnicas BKD



Universidad Austral de Chile  
Instituto de Patología Animal



Valdivia, 15 de Marzo de 2016.

Sres. Laboratorio de Diagnóstico  
Presente

Estimados Sres.:

En el marco de proyecto FIP 2014-61 "Estudio en epidemiología y técnicas de diagnóstico para enfermedades exóticas o emergentes con énfasis en *Piscine Reovirus* (PRV) y *Renibacterium salmoninarum* (BKD)", solicitamos a Ud., su colaboración indicándonos las técnicas utilizadas en su laboratorio para el diagnóstico de BKD.

Agradeciendo su colaboración le saluda atentamente,

DR. RICARDO ENRIQUEZ SAIS  
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.  
**Jefe de Laboratorio**  
Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática  
**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**



**ENCUESTA**  
**TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE BKD**

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO: Acuícola Alas SEDE: Osorno

**REPRODUCTORES:**

PCR CONVENCIONAL	<input type="checkbox"/>
RT PCR	<input type="checkbox"/>
PCR ANIDADO	<input type="checkbox"/>
PCR MULTIPLEX	<input type="checkbox"/>
INMUNOFLUORESCENCIA	<input type="checkbox"/>
CULTIVO EN AGAR	<input type="checkbox"/>
ANTIBIOGRAMA	<input type="checkbox"/>

OTRAS TÉCNICAS...qPCR.....

**PECES EN PRODUCCIÓN:**

PCR CONVENCIONAL	<input type="checkbox"/>
RT PCR	<input type="checkbox"/>
PCR ANIDADO	<input type="checkbox"/>
PCR MULTIPLEX	<input type="checkbox"/>
INMUNOFLUORESCENCIA	<input type="checkbox"/>
CULTIVO EN AGAR	<input type="checkbox"/>
ANTIBIOGRAMA	<input type="checkbox"/>

OTRAS TÉCNICAS...qPCR.....



**ENCUESTA**  
**TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE BKD**

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO: **Laboratorio Central Marine Harvest**      SEDE: **Puerto Montt**

- REPRODUCTORES:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....

- PECES EN PRODUCCIÓN:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....





**ENCUESTA**  
**TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE BKD**

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO: Laboratorio Antares S.A (Alab) SEDE: Puerto Montt (única)

- REPRODUCTORES:
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS PCR y RT-PCR Tiempo real

- PECES EN PRODUCCIÓN:
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS PCR y RT-PCR Tiempo real

*Alex Marinovic*  
LABORATORIO ANTARES S.A.  
RUT 16.300.285-9



ENCUESTA  
TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE BKD

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO: ALWAGESTIÓN SEDE: PUERTO VARAS

- REPRODUCTORES:
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....

- PECES EN PRODUCCIÓN:
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....



**ENCUESTA**  
**TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE BKD**

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO: **ADL Diagnostic Chile Ltda.**      SEDE: **Villarrica**

- REPRODUCTORES:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....

- PECES EN PRODUCCIÓN:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....



**ENCUESTA**  
**TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE BKD**

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO: ADL Diagnostic Chile Ltda. SEDE: Puerto Montt

- REPRODUCTORES:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....

- PECES EN PRODUCCIÓN:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....



**ENCUESTA**  
**TECNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE BKD**

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO: ADL Diagnostic Chile Ltda. SEDE: Puerto Aysén

- REPRODUCTORES:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....

- PECES EN PRODUCCIÓN:**
- PCR CONVENCIONAL
  - RT PCR
  - PCR ANIDADO
  - PCR MULTIPLEX
  - INMUNOFLUORESCENCIA
  - CULTIVO EN AGAR
  - ANTIBIOGRAMA

OTRAS TÉCNICAS.....