

---

## INFORME FINAL

*PROYECTO FIP N° 2014-60: "DETERMINACIÓN DE FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS DE RIESGO EN LA PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA".*

---

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO  
Facultad de Ciencias  
Instituto de Química y Bioquímica  
Laboratorio de Virología

## RESUMEN EJECUTIVO

En este informe final se presentan todas las actividades realizadas hasta marzo del 2017, incorporando todos los resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto, además se incluyen las respuestas a las observaciones realizadas por el evaluador al pre-informe final y la información general y conclusiones del taller de difusión de resultados del proyecto.

Como resultado del objetivo 1, la Revisión Bibliográfica se dividió en 4 temas principales: Enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa, Agente etiológico, Técnicas de diagnóstico, y Epidemiología y control. Las referencias fueron incluidas y ordenadas de acuerdo a los temas contenidos en la revisión bibliográfica; considerando además si corresponden a artículos indexados o no indexados (literatura gris). Junto a este informe se entrega una base de datos completa en formato digital.

Los principales avances que se han realizado en los últimos 10 años de investigación de la Necrosis Pancreática Infecciosa, tienen relación con: la caracterización molecular y filogenia de aislados del virus de la necrosis pancreática infecciosa; el desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico para la detección y genotipificación del virus; la virulencia del virus y posibles marcadores moleculares para determinarla; la interacción patógeno-hospedador y la respuesta inmune presentada frente a la infección con el virus; los factores de riesgo que pueden influenciar la aparición de brotes de la enfermedad; y la heredabilidad y descubrimiento de marcadores genómicos para la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, se requiere seguir investigando temáticas relacionadas con el genoma completo de los aislados, lo que permite confirmar la generación de nuevas cepas del virus producto de reordenamiento viral. Así como también la relación hospedador-específica en muestras de campo determinada en Chile (genogrupo 1 y 5), la cual debe ser confirmada mediante desafíos experimentales que evalúen la mortalidad causada por aislados de ambos genogrupos en las distintas especies de salmónidos cultivadas en el país. La virulencia en base a marcadores específicos de aminoácidos, se ha estudiado principalmente en desafíos con aislados del genogrupo 5 y generalmente no coincide con las mortalidades reportadas en el campo, por lo que se requiere ampliar este tipo de estudios y asociarla a otros factores genéticos del virus, y/o una combinación de factores ambientales y del hospedador que puedan tener un efecto en la virulencia del IPNV. Con respecto a la epidemiología, existen muy pocos estudios de factores de riesgo para la presentación de brotes de IPN, especialmente en la fase de agua dulce, y aún no es claro si los brotes en esta etapa predisponen a los peces a IPN durante la etapa de engorda en mar. Sería conveniente entonces verificar dos hipótesis: (1) los alevines sobrevivientes a un brote de IPN

siguen hospedando al virus y por lo tanto presentan un mayor riesgo de generar otro brote luego del traspaso al mar, y (2) los alevines sobrevivientes a un brote son inmunes a brotes posteriores. Por último un factor que requiere mayor investigación, es la utilización de peces con QTL para la resistencia a IPN y su relación con la disminución en el riesgo de brotes de la enfermedad o en la mortalidad asociada a esta.

En relación al objetivo 2, se realizaron 26 muestreos en total, desde el 20 de agosto del 2015 hasta el 23 de noviembre del 2016. Dieciocho corresponden a pisciculturas y 8 a centros de mar, distribuidos entre la Región del Bío-Bío y la de Magallanes. De estos muestreos, 20 corresponden a la especie *Salmo salar*, 3 a *Oncorhynchus kisutch* y 3 a *O. mykiss*, 10 de ellos corresponden a alevines, 12 a smolt y 4 a peces adultos. Para cada uno de los centros se analizaron muestras de tejidos de los peces mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFAT), dos técnicas de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) y un PCR anidado, para determinar la presencia del virus IPN. Los resultados obtenidos para estos análisis de diagnóstico, muestran que, del total de muestras analizadas, la mayoría (39) resultó positiva para al menos una de las técnicas empleadas, siendo la técnica de PCR anidado la que logró detectar el virus en un mayor número de muestras (50). Las dos técnicas de PCR en tiempo real (qRT-PCR VP1 y VP2), mostraron resultados similares a los obtenidos mediante IFAT, es decir, 38 muestras fueron positivas para las dos técnicas de qRT-PCR y 37 para IFAT, demostrando esta última técnica la presencia de virus con capacidad infectiva. En general, los resultados de las técnicas moleculares se correlacionan con los títulos virales obtenidos para cada muestra y con las mortalidades que presentó cada centro al momento del muestreo. De los 26 muestreos analizados, el aislamiento de IPNV fue exitoso en el 100% de los casos, obteniéndose al menos un aislado de cada centro muestreado, en total se cuenta con 50 aislados del virus que ya han sido caracterizados y almacenados en el cepario del Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso.

En relación a la presentación de los signos clínicos de la enfermedad, de las muestras analizadas se observa que todas presentaron signos de enfermedad, algunas con signos más específicos y agudos para IPN (i.e. ANEP, IFGF, FHON, ASKR, RPCO, IPFA2°, PPVD, PMLC, GMTS, IGFH, TAMB, CKBG, SFAA, CHMD, PLNO y PERA), y otras con signos menos específicos (i.e. QHPF, CMOO, SFJL, RTTX, HYBS, IPFA, PRBE, JGHL y EKLT). Sin embargo, se aislaron virus desde casi todas las muestras, salvo CHMD1, GMTS1 y SFJL1, lo que podría significar que ciertos IPNV obtenidos se encontraron en fase de infección subclínica, es decir, algunos centros presentaban peces con las secuelas de la infección por IPNV y/o eran portadores del

patógeno. Estos resultados se corroboran con los análisis histopatológicos ya que los peces con signología aguda por IPN mostraron lesiones necróticas y apoptóticas en los tejidos analizados. Además, la histopatología permitió asociar los peces con signología inespecífica, a un cuadro de tipo infeccioso subagudo a crónico, o a un cuadro clínico no infeccioso.

El análisis bioinformático demostró que 40 virus pertenecen al genogrupo 5, de los cuales el 100% fue obtenido a partir de *Salmo salar*, a su vez 12 pertenecen al genogrupo 1 y fueron obtenidos de *Oncorhynchus kisutch* y *O. mykiss*, sugiriendo una posible relación hospedador-específica. El genogrupo 5 se encuentra distribuido en casi todas las regiones muestreadas, desde la región de la Araucanía hasta la de Magallanes y el genogrupo 1 en las regiones del Bío-Bío, Los Ríos y Los Lagos. De acuerdo al análisis filogenético de un fragmento de 1180 pb y del segmento A completo, los virus aislados pertenecientes al genogrupo 1 forman un genotipo de virus chilenos, separados de las especies de referencia de este genogrupo, las cuales son de origen norteamericano. Al realizar el análisis filogenético del segmento B del virus, no se encontró esta misma separación de los aislados chilenos y las cepas de referencia del genogrupo 1. Al analizar los segmentos A y B completos de 15 aislados del virus, no se encontró evidencia de reordenamiento. Se identificaron aminoácidos en la proteína VP2, que han sido caracterizados como marcadores de virulencia para IPNV en 47 virus. Estos se clasifican como moderadamente virulentos, códigos GMTS, RTTX, HYBS, PERA, TAMB y RPCO (todos del genogrupo 1), virulentos códigos CHMD, SFAA, ASKR, QHPF, FHON, SLND, PPVD, IFGF, IPFA, JGHL, PRBE, IPFA2°, ANEP y EKLT (todos del genogrupo 5) y avirulentos códigos PMLC (excepto PMLC3), PLNO, CKBG, CMOO e IGHF (todos del genogrupo 5). En general, los marcadores de virulencia identificados se correlacionaron moderadamente con las mortalidades registradas en los centros muestreados. En donde la mayoría de las muestras con marcadores para avirulencia registraron mortalidades bajas o nulas asociadas a IPN, y varios de los que presentaron marcadores de virulencia registraron mortalidades relativamente altas. No obstante, algunos de los virus considerados virulentos, también presentaron mortalidades bajas (IPFA, JGHL, ANEP y EKLT) o incluso nulas (QHPF). Por otro lado, las muestras de código GMTS, que registraron las mortalidades más altas de la investigación, presentaron solamente los marcadores de virulencia moderada, al igual que el resto de los virus clasificados en el genogrupo 1. Esto es consistente con estudios anteriores, que no han encontrado relación entre las mortalidades vistas en campo y los marcadores de virulencia reportados, y confirma la necesidad de investigar nuevos marcadores moleculares diferenciales para cada genogrupo.

En relación al objetivo 3, para la identificación de los factores de riesgo y de tipo protectorio de IPN se analizó un total 87 centros acuícolas en fase de agua dulce (n=43) y mar (n=44). La información se obtuvo de los centros con y sin brotes de IPN a través de la aplicación de encuesta epidemiológica, además de la información proporcionada por Sernapesca de eventos estresantes previos a la aparición del brote, los cuales se clasificaron en eventos de tipo ambiental, otras enfermedades, manejos sanitarios, manejos productivos y ataques de depredadores entre otros.

La información se obtuvo entre octubre 2016 a marzo 2017, posteriormente, las bases de datos de los centros del estudio fueron validadas y se seleccionaron las variables para el análisis estadístico epidemiológico.

En los centros que presentaron mortalidad por IPN, se identificó dos genogrupos del virus identificado como 1 y el 5 siendo este último el más frecuente. Los peces fueron afectados en etapas iniciales del desarrollo (centros de agua dulce) así como en adultos (centros de engorda). Se diagnosticó la enfermedad en tres especies, *S. salar*, *O. kisutch* y *O. mykiss* y se presentó en todas las áreas geográficas donde se producen los salmones en Chile y durante todo el año.

Como evaluación de las medidas preventivas aplicadas tanto en centros de agua dulce y de mar, se determinó que la aplicación de la vacuna ALPHAJECT actuó como factor protectorio frente a la aparición de la enfermedad, al igual que los periodos de invierno- verano. Del estudio de los eventos estresantes predisponentes a la enfermedad, se identificó como factor de alto riesgo de presentar un brote de IPN el haber tenido brotes de enfermedad por otras causas. Al realizar un análisis dirigido a solo los centros de agua dulce se determinó que aquellas empresas que realizan su limpieza y desinfección sin contratar empresas externas controlan la mejor manera la aparición de los brotes. En cuanto al análisis de los centros de mar es necesario recolectar más información para analizar esta etapa productiva en cuanto a factores de riesgo.

Con respecto al taller de difusión de resultados del proyecto, éste se realizó con éxito en la ciudad de Puerto Montt, con la asistencia de representantes de SERNAPESCA, SUBPESCA y de diversas empresas asociadas con la industria de la salmonicultura. Se presentaron los resultados de los objetivos antes expuestos, y se realizó una mesa redonda de preguntas al finalizar el taller. Dentro de las conclusiones y recomendaciones desprendidas del taller destacan: la necesidad de obtener mayor información desde las empresas para realizar nuevos estudios epidemiológicos; la importancia de la detección de peces portadores asintomáticos, así como de nuevos métodos diagnóstico más sensibles; y el impacto de peces con QTL para la resistencia a IPN.

## ABSTRACT

This final report presents all the activities carried out up to March 2017, incorporating all the results obtained during the execution of the project, and including the responses to the observations made by the evaluator to the final pre-report in a special section that was included at the beginning of the report. Finally, the general information of the project results dissemination workshop and its conclusions were included in a separate section.

As result of objective 1, the Bibliographic Review was divided into 4 main themes: Infectious Pancreatic Necrosis Disease, Etiologic Agent, Diagnostic Techniques, and Epidemiology and Control. The references were included and ordered according to the themes contained in the bibliographic review; considering also whether they correspond to indexed or non-indexed articles (gray literature). Along with this report, a complete database is delivered in digital format.

The main advances that have been made in the last 10 years of research on Infectious Pancreatic Necrosis are related to: the molecular characterization and phylogeny of infectious pancreatic necrosis virus isolates; the development and evaluation of new diagnostic techniques for detection and genotyping of the virus; the virulence of the virus and possible molecular markers to determine it; the pathogen-host interaction and immune response presented against infection with the virus; the risk factors that may influence outbreaks of disease; and the heritability and discovery of genomic markers for resistance to the disease. Nonetheless, it is necessary to continue investigating issues related to the complete genome of the isolates, which allows the confirmation of the generation of new strains of the virus, product of viral rearrangement. As well as the host-specific relation in field samples determined in Chile (genogroup 1 and 5), which must be confirmed by experimental challenges that evaluate the mortality caused by isolates of both genogroups in the different species of salmonids grown in the country. Virulence based on specific amino acid markers has been studied mainly in challenges with isolates of genogroup 5 and generally does not coincide with the mortalities reported in the field, so it is necessary to extend this type of studies, and to associate it with other genetic factors of the virus, and/or a combination of environmental and host factors that may have an effect on IPNV virulence. With respect to epidemiology, there are very few risk factor studies for the appearance of IPN outbreaks, especially in the freshwater phase, and it is still unclear whether outbreaks at this stage predispose fish to IPN during growing phase in the sea. It would be convenient to verify two hypotheses: (1) the fry surviving an outbreak of IPN continue to host the virus and therefore have a higher risk of generating another outbreak after the transfer to the sea, and (2) fry surviving an outbreak are immune to later outbreaks. Finally, a subject that requires

more research is the use of fish with QTL for resistance to IPN and its relation with the decrease in the risk of outbreaks of the disease or mortality associated with it.

In relation to objective 2, twenty-six samples were taken in total, from August 20 of 2015 to November 23 of 2016. Eighteen correspond to fish farms and eight to sea centers, distributed between the Bío-Bío Region and Magallanes. Of these samples, 20 correspond to the species *Salmo salar*, 3 to *Oncorhynchus kisutch* and 3 to *O. mykiss*. 10 of them correspond to fingerlings, 12 to smolt and 4 to adult fish. For each of the centers, fish tissue samples were analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFAT), two real-time RT-PCR techniques (qRT-PCR) and one nested PCR, to determine the presence of IPN virus. The results obtained for these diagnostic analyzes show that, of the total of analyzed samples, the majority (39) was positive for at least one of the techniques used, being the nested PCR the technique that was able to detect the virus in a greater number of samples (50). The two real-time PCR techniques (qRT-PCR VP1 and VP2) showed results similar to those obtained by IFAT, that is, 38 samples were positive for both qRT-PCR and 37 for IFAT, while this latter technique was able to demonstrate the presence of virus with infective capacity. In general, the results of the molecular techniques are correlated with the viral titers obtained for each sample and with the mortalities presented by each center at the time of sampling. Of the 26 sampled farms, the isolation of IPNV was successful in 100% of the cases, obtaining at least one isolate from each farm. In total there are 50 virus isolates that have already been characterized and stored in the collection of the Laboratory of Virology of the University of Valparaíso.

Regarding the presentation of clinical signs, all fish sampled showed signs of disease, some with more specific and acute signs for IPN (i.e. ANEP, IFGF, FHON, ASKR, RPCO, IPFA2, PPVD) and others with less specific signs (i.e. QHPF, CMOO, SFJL, RTTX, HYBS, IPFA, PRBE, JGHL and EKLT). However, viruses were isolated from almost all samples, except for CHMD1, GMTS1 and SFJL1, which could mean that certain IPN viruses were found to be in subclinical infection phase, that is, some centers had fish with signs of previous IPNV infection and/or were carriers of the pathogen. These results are corroborated by histopathological analyzes, since fish with acute IPN signology showed necrotic and apoptotic lesions in the analyzed tissues. In addition, histopathology allowed to associate fish with nonspecific signology, to a subacute to chronic infectious type, or to a noninfectious clinical picture.

The bioinformatic analysis showed that 40 viruses belong to genogroup 5, of which 100% were obtained from *Salmo salar*. Only 12 belong to genogroup 1 and were obtained from

*Oncorhynchus kisutch* and *O. mykiss*, suggesting a possible host-specific relationship. Genogroup 5 is distributed in almost all the regions sampled, from the region of Araucanía to Magallanes, while genogroup 1 was found in the regions of Bío-Bío, Los Ríos and Los Lagos. According to the phylogenetic analysis of a fragment of 1180 bp and the complete segment A, isolated viruses belonging to genogroup 1 form a genotype of Chilean viruses, separated from the reference strains of this genogroup, which are of North American origin. When we performed the phylogenetic analysis of the B segment of the virus, this separation of the Chilean isolates and the reference strains of genogroup 1 was not found. When we analyzed the complete A and B segments of 15 virus isolates, no evidence of rearrangement was found. Amino acids that have been characterized as virulence markers for IPNV were identified in the VP2 protein of 47 viruses. These are classified as moderately virulent, GMTS, RTTX, HYBS, PERA, TAMB and RPCO (all from genogroup 1), virulent CHMD, SFAA, ASKR, QHPF, FHON, SLND, PPVD, IFGF, IPFA, JGHL, PRBE, IPFA2 °, ANEP and EKLT (all from genogroup 5) and avirulent PMLC codes (except PMLC3), PLNO, CKBG, CMOO and IGHF (all from genogroup 5). In general, the identified virulence markers correlated moderately with the mortalities recorded at the sampled farms. Where most of the samples with avirulence markers registered low or zero IPN-associated mortalities, and several of those with virulence markers recorded relatively high mortalities. However, some of the viruses considered virulent also had low (IPFA, JGHL, ANEP and EKLT) or even zero (QHPF) mortality. On the other hand, the GMTS code samples, which recorded the highest mortalities of the investigation, presented only moderate virulence markers, as did the rest of the viruses classified in genogroup 1. This is consistent with previous studies that have not found a relationship between field mortalities and reported virulence markers, and confirms the need to investigate new differential molecular markers for each genogroup.

In relation to objective 3, a total of 87 freshwater (n = 43) and sea (n = 44) aquaculture centers were analyzed for the identification of risk and protective IPN factors. The information was obtained from the centers with and without outbreaks of IPN through the application of an epidemiological survey, in addition to the information provided by Sernapesca of stressful events prior to the onset of the outbreak, which were classified in environmental events, others diseases, sanitary management, productive management and attacks of predators, among others.

The information was obtained between October 2016 and March 2017, after which the databases of the study centers were validated and the variables for the epidemiological statistical analysis were selected.

In the centers that presented IPN mortality, genogroups 1 and 5 of the virus were identified, the latter being the most frequent. Fish were affected in early stages of development (freshwater centers) as well as in adults (fattening centers).

The disease was diagnosed in three species, *S. salar*, *O. kisutch* and *O. mykiss*, and it was present in all geographic areas where salmon are produced in Chile and throughout the year.

As an evaluation of the preventive measures applied both in freshwater and sea centers, it was determined that the application of the ALPHAJECT vaccine acts as a protective factor against the onset of the disease, as well as the winter-summer periods. From the study of the stressful events predisposing to the disease, it was identified as a high risk of present an IPN outbreak, the fact of previously have had outbreaks of other diseases. When conducting an analysis directed to only the fresh water centers it was determined that those companies that carry out their cleaning and disinfection without hiring outside companies, control the best way the emergence of the outbreaks. As for the analysis of the sea centers, it is necessary to collect more information to analyze this productive stage in terms of risk factors.

With regard to the project results dissemination workshop, it was successfully carried out in the city of Puerto Montt, with the assistance of representatives of SERNAPESCA, SUBPESCA and various companies associated with the salmon industry. The results of the objectives set out above were presented, and a round table discussion was held at the end of the workshop. Among the conclusions and recommendations of the workshop are: the need to obtain more information from companies to carry out new epidemiological studies; the importance of the detection of asymptomatic carriers, as well as new, more sensitive diagnostic methods; and the impact of fish with QTL for resistance to IPN.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen Ejecutivo .....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabla de Contenido .....</b>	<b>10</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>12</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>16</b>
<b>Respuestas Observaciones Evaluador .....</b>	<b>18</b>
<b>1) Respuestas Aspectos Formales. ....</b>	<b>18</b>
<b>2) Respuestas Aspectos de Contenido. ....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>19</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>19</b>
<b>Metodología de trabajo .....</b>	<b>23</b>
Metodología Objetivo 1 .....	23
Metodología Objetivo 2 .....	24
Muestreos en Terreno .....	25
Análisis de muestras y aislamiento de virus.....	29
Secuenciación de los aislados.....	30
Análisis bioinformático de las secuencias y epidemiología molecular .....	32
Metodología Objetivo 3 .....	33
Tamaño de Muestra y Poder de la prueba para estudios de Casos y Controles.....	33
Metodología de recolección de la información .....	34
<b>Planificación Actividades Futuras .....</b>	<b>37</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>41</b>
<b>RESULTADOS OBJETIVO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>41</b>
Enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa .....	41
<i>Manifestaciones Clínicas e Histopatología</i> .....	43
Agente etiológico.....	47
<i>Clasificación y Distribución</i> .....	48
<i>Virulencia</i> .....	61
Técnicas de diagnóstico .....	65
<i>Cuantificación del Virus</i> .....	67
Epidemiología y control .....	74
<i>Transmisión</i> .....	74
<i>Reservorios</i> .....	74
<i>Factores de riesgo</i> .....	77
<i>Control y Vacunas</i> .....	79

<i>Resistencia Genética</i> .....	79
Conclusiones y recomendaciones.....	80
REFERENCIAS REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	82
Referencias Enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa .....	82
Referencias Agente etiológico.....	84
Referencias Técnicas de Diagnóstico .....	90
Referencias Epidemiología y Control.....	92
<b>RESULTADOS OBJETIVO 2: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS</b>	
<b>VIRALES</b> .....	95
Muestreos en Terreno.....	95
Mortalidad por IPN de los Centros Muestreados .....	100
Resultados Diagnóstico y Cepario .....	105
Signología Clínica .....	112
Histopatología.....	118
Secuenciación y Análisis Bioinformático .....	123
Marcadores de Virulencia .....	132
Distribución Geográfica por Genogrupos-Especie y Asociación con Mortalidad .....	134
<b>RESULTADOS OBJETIVO 3</b> .....	137
Etapa de recepción de encuestas epidemiológicas e información de los casos según semana epidemiológica y construcción de la base de datos. ....	137
Determinar factores de riesgo y protectivos en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa. ....	137
<b>Análisis y discusión de los resultados</b> .....	147
<b>Taller de Difusión de Resultados</b> .....	153
<b>Conclusiones</b> .....	158
Objetivo 1: .....	158
Objetivo 2: .....	158
Objetivo 3: .....	160
Taller de difusión: .....	160
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	161
<b>Anexos</b> .....	164
Anexo 1: Personal participante por actividad y objetivo específico .....	164
Anexo 2: Ficha de Muestreo.....	168
Anexo 3: Encuestas Epidemiológicas Control.....	171
Anexo 4: Encuestas Epidemiológicas Caso .....	177
Anexo 5: Material fotográfico recopilado durante la ejecución del proyecto .....	183
Anexo 6: Manuscrito publicado y manuscrito enviado.....	191

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la anatomía interna en un pez, en rojo se resaltan los órganos a muestrear.....	27
Figura 2. Esquema de la conformación de pools con los órganos muestreados.....	28
Figura 3. Alevines de truchas infectadas con virus IPN. Presentan abdomen distendido, piel oscura y exoftalmia.....	44
Figura 4. Necropsia de pez en donde se observan algunos de los signos clínicos asociados a IPN. A) Hígado amarillo; B) Intestino congestivo; C) Ciegos pilóricos congestivos; D) Hemorragias petequiales en grasa visceral; E) Vejiga natatoria inflamada; F) Corazón pálido; G) Aletas raídas; H) Ascitis hemorrágica. ....	45
Figura 5. Hallazgos histopatológicos relacionados con IPN (↑). Tinción con hematoxilina-eosina. A) Ciegos pilóricos: Atrofia del páncreas exocrino, con tejido conectivo residual y congestión de tejido adiposo peripancreático; B) Ciegos pilóricos: Atrofia de vellosidades en mucosa cecal; C) Páncreas: Necrosis y apoptosis en páncreas exocrino; D) Hígado: Necrosis de hepatocitos e infiltrado leucocitario mononuclear.....	46
Figura 6. Resumen de los distintos grupos genéticos de birnavirus acuáticos, distribuidos mundialmente. (Elaboración: Laboratorio de Virología, UV). ....	56
Figura 7. Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias de aminoácidos, del segmento de 1180 pb del gen VP2, entre las muestras secuenciadas en este trabajo (círculos negros) y las secuencias de referencia de (Mutoloki & Evensen 2011); (Calleja et al. 2012) y (Blake et al. 2001). Para el análisis filogenético se utilizó el método Neighbor-joining, y la robustez del árbol se evaluó a través de 1000 iteraciones de bootstrap. (Fuente: (Tapia et al. 2015)).....	60
Figura 8. A. Microfotografía de células CHSE-214 utilizadas como control no infectado y en B infectadas con virus IPN. Tras 6 horas pi, las células fueron tratadas para realizar el método de TUNEL. Aumento de 400X. Espinoza & Kuznar (2010). ....	66
Figura 9. Tras diluir la muestra e infectar la monocapa de células es posible apreciar las placas de lisis, tras varias horas post infección (A). Ésta corresponde al efecto producido por la actividad biológica, de una sola partícula viral, cuyo virus progenie fue infectando solamente a las células vecinas, generando un efecto lítico concéntrico, llamada Placa de Lisis (B). ....	68
Figura 10: Ensayos de Inmunodot y ELISA. Detección directa del virus IPN mediante ELISA e inmunodot en extractos de alevines infectados. Las manchas de inmunodot (A), se disponen en el extremo superior del gráfico y en forma correlativa con los resultados del ensayo de ELISA (B), Cifuentes et al. (1990). ....	69

- Figura 11: Inmunofluorescencia de células CHSE-214 infectadas con virus IPN. Tras la aplicación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra VP2, se utiliza un segundo anticuerpo, anti ratón conjugado con FITC, el cual emite una fluorescencia verde, cuando es excitado con una luz de longitud de onda de 480 nm, aumento de 400X. (Fotografía gentileza de Juan Carlos Espinoza).  
..... 71
- Figura 12. Mapa que muestra la distribución de los centros muestreados durante el proyecto. Símbolos indican ● : Región del Bío-Bío, ● : Región de la Araucanía, ● : Región de los Ríos, ● : Región de los Lagos, ● : Región de Aysén, ● : Región de Magallanes. .... 99
- Figura 13. Mortalidad total asociada a IPN en los centros muestreados desde la semana 20 del 2015 a la semana 50 del 2016. .... 101
- Figura 14. Resultados inmunofluorescencia indirecta (IFAT) de IPNV, para cada uno de los muestreos, indicados con el código de muestreo en cada foto. Se muestra un ejemplo por centro de células CHSE-214 infectadas con el virus: la fluorescencia indica el marcaje de la proteína VP2 con FITC (aumento 400X). .... 108
- Figura 15. Resultados inmunofluorescencia indirecta (IFAT) de IPNV, para cada uno de los muestreos, indicados con el código de muestreo en cada foto. Se muestra un ejemplo por centro de células CHSE-214 infectadas con el virus: la fluorescencia indica el marcaje de la proteína VP2 con FITC (aumento 400X). .... 109
- Figura 16. Signos clínicos asociados a las muestras en orden de aparición. 1) CHMD: • Hígado pálido; • Ciegos pilóricos congestivos; • Grasa visceral hemorrágica; • Intestino con paredes hemorrágicas. 2) SFAA: A • Hígado amarillo; • Ciegos pilóricos congestivos; • Grasa visceral con hemorragias petequiales; • Intestino con paredes congestivas 3) GMTS: • Hígado pálido y congestivo; • Ciegos pilóricos congestivos; • Grasa visceral congestiva. 4) SFJL: • Branquias pálidas; • Hígado pálido. 5) RTTX: • Corazón pálido; • Hígado pálido. 6) ASKR: • Oscurecimiento en piel. 7) HYBS: • Ciegos pilóricos congestivos; • Intestino con paredes congestivas. 8) QHPF: • Grasa visceral congestiva. .... 115
- Figura 17. Signos clínicos asociados a las muestras en orden de aparición. 1) FHON: • Hígado pálido; • Grasa visceral congestiva. 2) PMLC: • Hígado amarillo con focos hemorrágicos; • Grasa visceral congestiva. 3) PPVD: • Hígado pálido; • Grasa visceral y ciegos pilóricos con petequias. 4) IFGF: • Hígado pálido; • Ascitis. 5) IPFA: • Hígado pálido. 6) JGHL: • Corazón pálido; • Hígado pálido; • Intestino con paredes congestivas. 7) PRBE: • Hígado pálido y congestivo; • Grasa visceral con petequias; • Ciegos pilóricos congestivo. 8) IPFA<sup>2º</sup>: • Hemorragias perioculares. .... 116
- Figura 18. Signos clínicos asociados a las muestras en orden de aparición. 1) ANEP: • Hígado pálido y congestivo; • Ciegos pilóricos congestivos; • Cavidad abdominal con adherencias; • Intestino con paredes congestivas. 2) PLNO: • Sistema digestivo con contenido líquido mucosa. 3) CKBG: • Hígado pálido y congestivo; • Grasa visceral congestiva; • Intestino con paredes

congestivas. 4) TAMB: •Ano protruído y con exudado amarillo. 5) EKL: •Cerebro congestivo. 6) CMOO: •Hígado con hepatomegalia; •Grasa visceral congestiva. 7) IGHF: •Hígado pálido con focos hemorrágicos y hepatomegalia; • Cuidad abdominal con sangre; • Ciegos pilóricos congestivos; •Grasa visceral congestiva; • Intestino con paredes congestivas. 8) RPCO: •Aletas hemorrágicas. .... 117

Figura 19. Signos histopatológicos asociados a signología aguda en las muestras (↑). Tinción con hematoxilina-eosina. 1) Detritus celular intraluminal en ciegos pilóricos; 2) Necrosis y hemorragia focal en páncreas exocrino; 3) Necrosis severa en páncreas exocrino y apoptosis celular; 4) Necrosis de coagulación difusa en páncreas exocrino con atrofia de tejido adiposo; 5) Necrosis de coagulación difusa en hepatocitos; 6) Degeneración microvacuolar y necrosis de coagulación en hepatocitos; 7) Necrosis y exfoliación epitelial en ciegos pilóricos; 8) Necrosis focal en parénquima hepático; 9) Autólisis leve, con hepatocitos en los cuales es posible observar necrosis de células aisladas; 10) Necrosis de coagulación en tejido de páncreas exocrino. .... 121

Figura 20. Signos histopatológicos asociados a signología subaguda a crónica en las muestras (↑). Tinción con hematoxilina-eosina. 1) Macronúcleos en hepatocitos con degeneración vacuolar; 2) Atrofia severa de páncreas exocrino con inflamación mononuclear intersticial; 3) Atrofia de vellosidades cecales; 4) Degeneración de tejido adiposo con atrofia de páncreas exocrino; 5) Degeneración vacuolar en citoplasma y apoptosis de hepatocitos; 6) Atrofia difusa en páncreas exocrino y degeneración de tejido adiposo; 7) Atrofia de páncreas exocrino y de tejido adiposo; 8) Atrofia y degeneración vacuolar en hepatocitos; 9) Hemorragia intersticial focal en tejido adiposo; 10) Atrofia y fibrosis en páncreas exocrino; 11) Atrofia de tejido adiposo; 12) Atrofia difusa de páncreas exocrino. .... 122

Figura 21. Signos histopatológicos inespecíficos asociados a las muestras (↑). Tinción con hematoxilina-eosina. 1) Infiltrado inflamatorio mixto en espacio perivascular; 2) Infiltrado inflamatorio mononuclear focal en parénquima; 3) Infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial focal en páncreas exocrino. .... 123

Figura 22. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias de 523 pb analizadas en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificadas con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente. .... 126

Figura 23. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias de 1180 pb analizadas en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificadas con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente. .... 128

Figura 24. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias del segmento A en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificadas con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente. .... 130

Figura 25. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias del segmento B en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificadas con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente. ....	131
Figura 26. Mapa que muestra la distribución geográfica de los genogrupos por especie. ●: Genogrupo 5, <i>Salmo salar</i> , ●: Genogrupo 1, <i>Oncorhynchus spp.</i> <b>A:</b> Región Bio-Bío a los Lagos, <b>B:</b> Región de Aysén y Magallanes. ....	135
Figura 27. Mortalidad por IPN presentada en los 26 centros muestreados, desde la semana 20-52 del 2015, más las semanas 1-50 del 2016. El color azul y rojo de los diferentes símbolos indica virus genogrupo 5 y 1, respectivamente. ....	136
Figura 28. Lista de participantes al Taller Proyecto FIPA 2014-06. ....	155
Figura 29. Registro Fotográfico del Taller. ....	157

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores y sondas utilizados para las reacciones de RT-PCR en tiempo real y determinación del gen de referencia ELF1.....	30
Tabla 2. Carta Gantt. ....	40
Tabla 3. Signos clínicos asociados a una infección por virus IPN.....	44
Tabla 4. Signos histológicos asociados a una infección por virus IPN. ....	46
Tabla 5. Clasificación de aislados birnavirus acuáticos mediante seroneutralización por (Hill & Way 1995) y análisis genómico (Blake et al. 2001) (Fuente: Modificado tabla de Munro & Midtlyng (2011))......	51
Tabla 6. Información de los muestreos realizados durante la ejecución del proyecto. ....	96
Tabla 7. Mortalidad asociada a IPN reportada en la ficha de muestreo y de acuerdo a la base de datos entregada por Sernapesca. ....	102
Tabla 8. Resumen resultados de diagnóstico de muestras IPNV.....	106
Tabla 9. Cepario aislados virus IPN conteniendo la información básica para cada uno de los virus aislados. ....	110
Tabla 10. Signos clínicos asociados a IPNV encontrados en las muestras analizadas. Con una X se destaca la signología encontrada exclusivamente en las fotos de la necropsia. Ensombrecido se presenta la signología comúnmente asociada a un cuadro agudo por IPNV.....	114
Tabla 11. Signos histopatológicos asociados a IPNV identificados en las muestras analizadas de tejido de hígado, ciego y páncreas. El análisis se presenta en base a una muestra positiva proveniente de cada centro. Se destacan en rojo y gris los signos asociados a un cuadro agudo y un cuadro subagudo a crónico por IPNV, respectivamente.....	120
Tabla 12.. Resumen secuenciación muestras. ND=No disponible.....	124
Tabla 13. Residuos de aminoácidos presentes en el segmento A (VP2) y B (VP1), en posiciones asociadas a motivos de virulencia de acuerdo a Santi <i>et al.</i> (2004), Song <i>et al.</i> (2005), Bruslind & Reno (2000) y Shivappa <i>et al.</i> (2004) Ensombrecidos aislados virulentos. A=Alanina, T=Treonina, I=Isoleucina, H=Histidina, ND=No disponible, IND=Indeterminado. ....	133
Tabla 14. Caracterización epidemiológica de los brotes de IPNV en centros del estudio entre el periodo de agosto 2015- marzo 2017. ....	138
Tabla 15. Descripción de medidas preventivas utilizadas para el control de IPNV en centros de agua dulce y de mar. ....	140

Tabla 16. Modelo final del análisis multivariado regresión logística para la determinación de los factores de riesgo y protectivos en peces de cultivo en mar y agua dulce. ....	141
Tabla 17. Caracterización productiva de los centros de agua dulce con y sin brotes de IPNV. ....	142
Tabla 18. Descripción del origen de las ovas, peces y de actividades asociadas al proceso de limpieza y desinfección de los centros de agua dulce según presentación de brote. ....	143
Tabla 19. Resultados del análisis multivariado regresión logística para la determinación de los factores de riesgo y protectivos en peces de cultivo de agua dulce. ....	144
Tabla 20. Caracterización productiva de los centros de mar con y sin brotes de IPNV. ....	145
Tabla 21. Descripción del origen de las ovas y de actividades asociadas al proceso de limpieza y desinfección de los centros de mar según presentación de brote. ....	146
Tabla 22. Lista de participantes al Taller Proyecto FIPA 2014-06 .....	154
Tabla 23.: Personal participante del proyecto por objetivo y tiempo asignado .....	164

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Personal participante por actividad y objetivo específico .....	164
Anexo 2: Ficha de Muestreo .....	168
Anexo 3: Encuestas Epidemiológicas Control.....	171
Anexo 4: Encuestas Epidemiológicas Caso.....	177
Anexo 5: Material fotográfico recopilado durante la ejecución del proyecto .....	183
Anexo 6: Manuscrito publicado y manuscrito enviado .....	191

## RESPUESTAS OBSERVACIONES EVALUADOR

### 1) RESPUESTAS ASPECTOS FORMALES.

No hubo observaciones en relación a los aspectos formales.

### 2) RESPUESTAS ASPECTOS DE CONTENIDO.

#### a) Desarrollo del proyecto.

Objetivo n°1 y 2: No hay observaciones que responder

Objetivo específico n°3: Los antecedentes solicitados a Sernapesca se recibieron y fueron incorporados al análisis estadístico, la información se complementó con los antecedentes proporcionados por la industria. Los eventos catalogados como estresantes se definieron como: enfermedades previas a 30 día del brote de IPN, manejos sanitarios, manejos productivos, daño mecánico, depredadores (lobo, pájaros), ambiental (bajo oxígeno, turbidez, bloom algas). Esta información fue de gran aporte ya que permitió determinar como factor riesgo el tener brotes de otras enfermedades.

En relación a b) Plan de actividades, c) Equipo de trabajo y 3) Evaluación de base de datos, no hay observaciones que responder.

### 3) OBSERVACIÓN SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA.

Siguiendo la sugerencia de la División de Acuicultura de la SUBPESCA, se actualizó la información presentada en la sección Antecedentes (párrafo 4), relativa a los reportes de IPNV publicados en los Informes Sanitarios de la Salmonicultura en Centros Marinos. Se utilizó así, la última información reportada por SERNAPESCA, vale decir, del Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos año 2015 y del Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos primer semestre 2016.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar factores epidemiológicos de riesgo y protectivos para la presentación de cuadros de Necrosis Pancreática Infecciosa.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Efectuar una revisión bibliográfica nacional e internacional respecto el estado del arte en relación al conocimiento de la enfermedad y del virus.
2. Identificar y caracterizar las cepas virales presentes en las diferentes zonas del país y diferentes especies de cultivo.
3. Determinar factores de riesgo y protectivos en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa.

## ANTECEDENTES

La enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es típica de la trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), el salvelino (*Salvelinus fontinalis*), la trucha común (*Salmo trutta*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y varias especies de salmones del Pacífico (*Oncorhynchus spp.*) (OIE 2006), siendo más susceptible a la infección *Salvelinus fontinalis* que *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo salar* (McCull et al. 2009). El agente etiológico es el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), que provoca que la enfermedad sea aguda, altamente contagiosa y que afecte principalmente a peces salmónidos de cultivo durante sus estadios de desarrollo en agua dulce, causando también mortalidad en peces adultos. Aunque no se han detectado signos clínicos patognomónicos para la enfermedad, entre los más comunes se pueden encontrar: oscurecimiento de la piel, hinchazón abdominal, exoftalmia, palidez de las branquias, bazo, corazón, hígado y riñón, y hemorragias petequiales en el tracto digestivo, áreas ventrales y aletas (Roberts & Pearson 2005; Munro & Midtlyng 2011). La mortalidad acumulada asociada a un brote puede variar desde menos de un 10% a más del 90% de los peces de un estanque (Jarp et al. 1994). Luego de un brote, los peces que sobreviven a la enfermedad y los que se infectan sin desarrollar signos clínicos pueden actuar como portadores, representando un riesgo para su descendencia y otros peces susceptibles (Bootland et al. 1986).

El IPNV es un virus de cápside desnuda, que mide aproximadamente 60 nm y pertenece a la familia *Birnaviridae*, genero *Aquabirnavirus* cuyos miembros se caracterizan por tener un genoma que

consiste en dos segmentos de doble cadena de RNA, llamados A y B. El segmento A del virus codifica para una pequeña proteína VP5, la cual no tiene una función definida y una más grande que consiste en una poliproteína que es cortada para formar la proteína de la capsida viral, VP2, una proteína interna, VP3, y una proteasa viral, VP4. El segmento B contiene un único marco de lectura el cual se traduce en la proteína VP1 que corresponde a la enzima responsable de la replicación del genoma viral (Dobos 1995).

En Chile el IPNV fue aislado por primera vez en 1984 (McAllister & Reyes 1984) y resultó pertenecer al serotipo 1, VR-299 (Espinoza et al. 1985), siendo similar a cepas norteamericanas. No obstante, la presencia de la enfermedad en el país se confirmó oficialmente en el año 1998 en cultivos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (TechnoPress & SalmonChile 2003). Desde entonces, el virus se extendió rápidamente por las diferentes áreas de cultivo del país, convirtiéndose progresivamente en uno de los principales patógenos, causando problemas sanitarios a la industria del salmón en etapas de agua dulce y posteriormente en el traslado de los peces al mar en el proceso de engorda. Estudios más recientes revelaron la presencia de dos genogrupos de *Aquabirnavirus*, el 1 y 5 (Mutoloki & Evensen 2011; Eissler et al. 2011; Calleja et al. 2012), según la clasificación de Blake et al. (2001), y sugieren que la cepa predominante en Chile es la tipo Sp, genogrupo 5, serotipo 2. En un trabajo más extensivo Tapia et al. (2015), presentan datos de diversas localidades geográficas, donde se observa la predominancia del genogrupo 5, cepas de virus con origen Europeo, y la presencia del virus en las especies *S. salar* y *O. mykiss*, distribuyéndose desde la región de la Araucanía hasta la región de Magallanes y de la Antártica Chilena.

A pesar de la importancia y persistencia del virus y la enfermedad en Chile, la información acerca de la epidemiología del IPNV es muy escasa. Según los dos últimos Informes Sanitarios de Salmonicultura en Centros Marinos publicados por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca 2016a y 2016b) el virus IPN sigue siendo una de las causas de mortalidades por enfermedades infecciosas, afectando principalmente al salmón del Atlántico, y en menor medida a la trucha Arcoíris y al salmón del Pacífico en centros de cultivo de mar. Sin embargo, existen pocos datos del impacto del IPNV en los centros de cultivo de agua dulce del país y la mortalidad que produce. Es por lo mismo que se hace necesario realizar un análisis exhaustivo de los distintos factores que pueden estar asociados a la epidemiología de la enfermedad como la frecuencia y magnitud de los brotes, su distribución geográfica, tanto en agua dulce como en agua de mar, y su

relación con los análisis moleculares y filogenéticos realizados a los virus que se aíslan de estos brotes.

Entre los métodos de detección de la enfermedad de IPN más utilizados, están los que apuntan a una determinación de la presencia de virus activo en distintas líneas celulares, los cuales se marcan con anticuerpos específicos para las proteínas VP2 y VP3 de acuerdo al método utilizado. Luego la proteína es marcada con FITC y se ve por medio de un microscopio con epifluorescencia, marcándose así solo las células infectadas por virus activo. Uno de los métodos de inmunofluorescencia más utilizados en Chile para este tipo de diagnóstico, está basado en el método propuesto por Espinoza & Kuznar (2002), cuyo blanco es la proteína VP2. Métodos de diagnóstico que son también complementarios y ampliamente utilizados por los laboratorios de diagnóstico, son los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dentro de estos existen una gran variedad de reacciones utilizadas, ya sea química SYBR-Green I, Taqman u otras similares, en las que cada Laboratorio selecciona la química de la reacción y los partidores que considera adecuados. En general y como está reportado en la literatura, el segmento A del IPNV ha sido utilizado con mayor frecuencia, específicamente la región que codifica para la proteína VP2 (e.g., Williams et al. 1999, Rodriguez Saint-Jean et al. 2001, Ørpetveit et al. 2010, Bowers & Dhar 2011, Eissler et al. 2011), también hay otros reportes en la literatura de la utilización de los segmentos NS o VP4 como objetivo e.g. Bowers et al. (2008). El gen para VP1 tiene un alto nivel de conservación que surge de la necesidad de preservar la actividad catalítica de una enzima clave en el ciclo de vida del IPNV, la polimerasa. Es por ello que también ha sido utilizado para diagnosticar la presencia del virus IPN (Eissler et al. 2011). Recientemente el Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso, en su calidad de Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de enfermedades de especies hidrobiológicas (Resol. Ex. 1448 del 6 de Julio 2011, Sernapesca), realizó una prueba de comparación inter-laboratorios de las distintas técnicas utilizadas por los laboratorios de diagnóstico nacionales para la detección del IPNV (Tapia et al. enviado). Los resultados mostraron una respuesta adecuada y certera en relación a la sensibilidad y especificidad reportada por los laboratorios, sin embargo también demostraron una gran heterogeneidad en los valores de Cts reportados para una misma muestra positiva, lo que da cuenta de la diversidad de las técnicas utilizadas y la necesidad de realizar la estandarización de las mismas, para lograr resultados de diagnóstico con mayor exactitud.

La Necrosis Pancreática Infecciosa es una enfermedad viral que emergió a la par con el desarrollo de la industria acuícola, y que actualmente se encuentra diseminada en los principales países productores de salmón, siendo considerada una enfermedad viral de alto riesgo en la Unión Europea (Ariel & Olesen 2001). La enfermedad posee una alta prevalencia, ya que se encuentra ampliamente distribuida en agua dulce y mar, a la vez que todos los grupos de edad de salmónidos son susceptibles a enfermarse (Bang & Kristoffersen 2015). A pesar de esto, no en todos los casos se manifiesta signología clínica ni mortalidades significativas, aunque los peces se encuentren infectados, por lo que prevenir la enfermedad, en vez de la infección, se ha vuelto una estrategia más factible para controlar el impacto de este patógeno en la acuicultura (Murray et al. 2004). Con la finalidad de poder controlar la enfermedad, es que actualmente se está trabajando en identificar los factores de riesgo ambientales y de manejo, asociado a los brotes de IPN (Bang & Kristoffersen 2015). Dentro de los métodos utilizados en acuicultura para determinar estos factores, se encuentra el análisis caso-control y el modelamiento de la propagación de la enfermedad (Murray 2006). El primero, y el cual será utilizado en este trabajo, consiste en analizar dos poblaciones, una con la enfermedad y otra sin ella, para posteriormente evaluar de manera retrospectiva, la exposición de estas poblaciones a determinados factores que pudieron haber desencadenado la enfermedad.

A continuación, se presentan en este informe final, todos los resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto, junto con las conclusiones del taller de difusión de resultados del proyecto, realizado en Puerto Montt el 26 de enero del 2017.

## METODOLOGÍA DE TRABAJO

La metodología se describe a continuación de acuerdo a los objetivos del proyecto. Se incluye también en el Anexo 2, el personal participante del proyecto por objetivo y tiempo asignado por actividad, además se describe la función de cada integrante del equipo por objetivo y actividad.

### *METODOLOGÍA OBJETIVO 1*

Para la revisión bibliográfica el campo de estudio primordial fueron artículos científicos, nacionales e internacionales, relacionados a la enfermedad IPN y su agente infeccioso, publicados en revistas científicas indexadas en las principales bases de datos online. Las bases de datos consultadas fueron:

- Web of Science (ISI)
- Scopus (Elsevier)
- Medline (PubMed)
- Scielo (Scientific Electronic Library Online)
- SciencDirect
- Google Scholar

En estas bases de datos se procedió a buscar los conceptos o palabras claves asociados a la enfermedad y al virus, los cuales fueron: IPN, IPNV, virus de la necrosis pancreática infecciosa, aquabirnavirus, diagnóstico, detección, virulencia, mortalidad, aislados, filogenia, caracterización molecular, transmisión, epidemiología, factores de riesgo, entre otros. Para realizar una búsqueda exhaustiva en las bases de datos, las palabras claves fueron ingresadas tanto en español como en inglés, y de forma libre o en combinaciones específicas relacionadas con los objetivos del estudio. Adicionalmente, se realizaron búsquedas a partir de nombres de autores y de referencias encontradas en publicaciones más recientes y revisiones del virus IPN. Todos los artículos hallados en base a estas búsquedas fueron ingresados en el programa EndNote X7, junto con sus correspondientes citas, donde fueron clasificados y agrupados en 5 grupos principales descritos a continuación:

- **La enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa:** Historia de la enfermedad, primeros reportes y descripciones. Mortalidades asociadas y especies afectadas. Signología clínica de la enfermedad e histopatología.

- **El agente etiológico:** Características físico-químicas. Genoma viral y proteínas codificadas. Estudios de clasificación taxonómica, serológica y molecular. Marcadores de virulencia.
- **Técnicas de diagnóstico:** Aislamiento en cultivo celular, ensayos basados en anticuerpos y métodos moleculares.
- **Epidemiología y control:** Transmisión del virus. Portadores asintomáticos y reservorios. Factores de riesgo. Medidas zoonositarias. Desinfección y descontaminación. Vacunas. resistencia genética y cría selectiva (QTL).

Por otra parte, se realizó también una búsqueda de toda la información y artículos no indexados en las bases de datos antes mencionadas. Esta “literatura gris” correspondió principalmente a reportes e informes de instituciones gubernamentales, tesis de pre grado y post grado, artículos de revistas de divulgación científica, presentaciones de conferencias e informes de proyectos, entre otros, relacionados con el virus IPN, la enfermedad y su impacto en la acuicultura. Esta búsqueda se llevó a cabo ingresando las palabras claves antes descritas en el metabuscador de Google ([www.google.cl](http://www.google.cl)). Además, para la revisión del IPNV en Chile se consideraron todos los reportes sanitarios de la salmonicultura nacional publicados en la página de Sernapesca, complementando esto con información que el Servicio nos ha facilitado directamente. Adicionalmente, se han incluido trabajos publicados en revistas de investigación, proyectos ejecutados en relación al mismo tema, tesis dirigidas y exposiciones realizadas en diversas conferencias nacionales e internacionales por el equipo de trabajo del Laboratorio de Virología.

Finalmente, las referencias fueron incluidas y ordenadas de acorde a los temas contenidos en la revisión bibliográfica: Enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa, agente etiológico, técnicas de diagnóstico, y epidemiología y control; considerando además si corresponden a artículos indexados o no indexados (literatura gris). Junto al informe, se entrega un CD con la base de datos de referencias ordenadas de acuerdo a estos 5 temas principales.

## *METODOLOGÍA OBJETIVO 2*

Para la identificación y caracterización de las cepas de IPNV presentes en el país se realizaron 26 muestreos en terreno, con el fin de aislar virus desde diferentes regiones, especies y estadios de desarrollo, para su posterior secuenciación y análisis bioinformático. Se planteó un tipo de muestreo dirigido a IPN, para esto se tomaron muestras en centros con brote o la presentación clínica de la enfermedad. Para la ejecución de estos muestreos, se realizaron reuniones con

inspectores de Sernapesca de las regiones VIII, IX, IVX, X, XI, y XII, y con distintas empresas salmoniculoras para presentarles el marco de desarrollo de la investigación y la metodología de muestreo, además de solicitar su colaboración en el proyecto. Además, se contrataron los servicios de la empresa Aquagestión para ayudar en la realización de los mismos. Esto último se implementó basado en las reuniones de coordinación y evaluación del proyecto, en las cuales se vio la necesidad de apoyar el muestreo realizado con la colaboración de Sernapesca.

Los centros a muestrear se determinaron de acuerdo a la base de datos que facilita el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, que tiene implementado un programa de vigilancia pasivo para enfermedades de salmónidos en los cuales está incluido el IPN. La información de diagnósticos y mortalidad provocada por IPN, es recibida por Sernapesca y procesada con un desfase de dos semanas, lo que permite en la mayoría de los casos, encontrar la enfermedad presente al momento del muestreo. Basados en este reporte se coordinaron los muestreos con los inspectores de Sernapesca y MV de Aquagestión. Se determinó un  $n = 30$  de centros a muestrear, como se describe en la metodología del objetivo 3, con un plazo máximo para su ejecución, según la carta Gantt, hasta fines de noviembre. Cabe destacar que este número estuvo sujeto a la aparición de la enfermedad dentro del plazo señalado.

A continuación se describe el procedimiento de muestreo y la metodología para el análisis de las muestras, el aislamiento de las cepas de IPNV, la secuenciación del genoma de los aislados y el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

## **Muestreos en Terreno**

Para la toma de muestras en terreno se confeccionó un manual de muestreo (el cual fue incluido en su totalidad en el Informe n°1), con el objetivo de establecer un procedimiento de muestreo dirigido a aplicar frente a brotes de IPN que se detecten en centros de cultivo de salmónidos, tanto de agua dulce como de mar, para lograr aislar e identificar los diferentes genogrupos del virus presente en el sistema acuícola productivo del país. De esta forma, el manual describe los procedimientos que deben ser aplicados para la elección, extracción y preservación de órganos o peces que serán utilizados como muestras biológicas, incluyendo las medidas de bioseguridad que deben ser consideradas por el personal involucrado en la realización del muestreo. El manual fue elaborado según lo especificado en la Norma Técnica N°1, del Programa Sanitario General, Laboratorios de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos del Servicio

Nacional de Pesca (Sernapesca 2012), y en el Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE 2006).

A continuación se detallan los procedimientos realizados para el muestreo en centros de cultivo que presentaron mortalidad asociada a IPN, según lo descrito en el manual de muestreo, desde la selección de peces a muestrear, la extracción de órganos y la preservación de las muestras.

Para la selección de ejemplares por centro de cultivo se tomaron en cuenta las siguientes condiciones:

- Seleccionar ejemplares orillados, con natación errática, o mortalidad fresca del día desde estanques o jaulas que presenten o hayan presentado mortalidad asociada a un brote específico de IPN y/o signología asociada en forma evidente a infección por IPN.
- En el caso de peces menores a 4 cm, se deben seleccionar como mínimo 20 ejemplares, y para peces mayores a esta medida se deben muestrear al menos 10 ejemplares, para la confección de pooles.
- Si el centro no cuenta con el número mínimo requerido de ejemplares en estas condiciones, se deberá completar la muestra con peces elegidos al azar.
- En el caso de que el centro presente o haya presentado más de una jaula o estanque con mortalidad o peces con signología clínica asociada a IPN, se debe escoger la que tenga mayor mortalidad o número de peces con signos.

La disección y extracción de órganos se realizó intentando siempre obtener muestras de órganos individuales de cada pez. Solo en el caso de peces demasiado pequeños (alevines con saco o alevines menores a 4 cm), los peces fueron muestreados completos, para luego extraer sus vísceras completas en el laboratorio. En peces mayores a 4 cm (alevines, smolts, post-smolts, juveniles y adultos) se extrajeron los órganos blanco, completos, o trozos de no más de 5 mm<sup>3</sup>. Los órganos blanco corresponden al riñón anterior y bazo, para los análisis de PCR, IFAT y cultivo celular, y al hígado y ciegos pilóricos para los análisis histopatológicos (Figura 1).

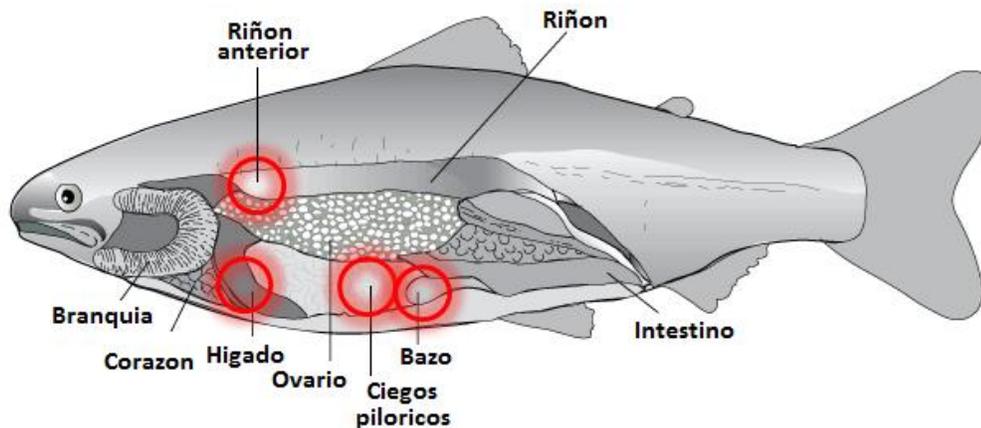


Figura 1. Esquema representativo de la anatomía interna en un pez, en rojo se resaltan los órganos a muestrear.

La conformación de pools y preservación de las muestras se llevó a cabo considerando los análisis de diagnóstico que se procederían a realizar con cada una, los cuales corresponden a PCR en tiempo real (qRT-PCR), inmunofluorescencia indirecta (IFAT), aislamiento en cultivo celular e histología. En el caso de los peces pequeños (< 4 cm de longitud), del total de 20 muestreados completos, 10 peces fueron utilizados para los análisis de PCR, IFAT y cultivo celular. Estos fueron divididos en dos pools de 5 peces cada uno y mantenidos sin preservantes dentro de una bolsa sellada, conservando siempre la refrigeración de las muestras. Los 10 peces restantes fueron utilizados para el análisis histológico por lo que fueron fijados completos en formalina tamponada al 10%, teniendo la precaución de hacer una incisión longitudinal en la piel de la región ventral para asegurar la penetración del fijador en los órganos internos. Para esto, los peces también fueron divididos en grupos de 5 y cada grupo fue almacenado en un frasco con formalina, manteniendo una proporción aproximada de 1:10. En el caso de los peces mayores a 4 cm, los tejidos extraídos (órganos completos o trozos de órganos de 5 mm<sup>3</sup>) de 5 peces fueron mezclados para conformar un pool, cuidando que el peso total del pool no sobrepasara los 1,5 g, y de acuerdo a las siguientes indicaciones:

- Muestras para Cultivo Celular, IFAT y qRT-PCR: preservar tejidos de riñón y bazo en tubos de centrifuga *fulcon* con medio de cultivo L-15 (color rosado), en una proporción aproximada de 1:5.
- Muestras para análisis histológicos: preservar hígado y ciegos pilóricos en frascos de toma de muestra con Formalina tamponada al 10%, en una proporción aproximada de 1:10.

De esta forma, del total de 10 peces muestreados (mayores a 4 cm) se conformaron dos pools de órganos (riñón y bazo) preservados en medio de cultivo y dos pools de órganos (hígado y ciegos pilóricos) fijados en formalina tamponada al 10% (Figura 2).

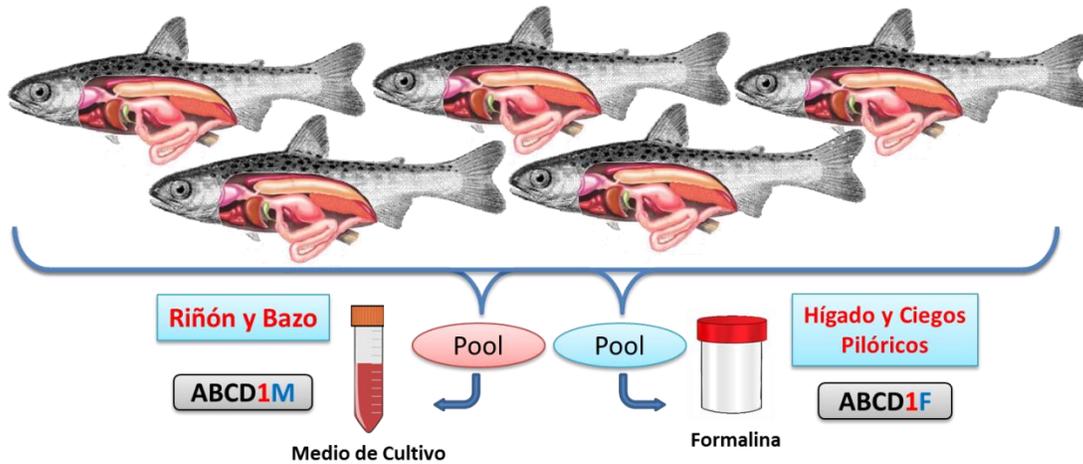


Figura 2. Esquema de la conformación de pools con los órganos muestreados.

Una vez obtenidas y almacenadas las muestras de tejidos, cada tubo y frasco fue rotulado con el código correspondiente al muestreo y al número y tipo de la muestra. Este código estaba formado por cuatro letras (identificador del muestreo), un número (identificador de la muestra) y una letra M o F, para diferenciar entre la muestra en medio de cultivo o formalina (Figura 2). Todas las muestras tomadas en terreno fueron enviadas con máxima prontitud al laboratorio de virología de la Universidad de Valparaíso vía Chilexpress o Correos de Chile para su análisis inmediato. Los tubos y frascos con muestras fueron enviados dentro de una bolsa de plástico *ziploc* de forma individual y en una caja de polietileno expandido, con una cantidad suficiente de *gelpacks* previamente congelados (-20°C) en su interior para mantener una condición de refrigeración de entre 4-10°C.

Junto con la toma de las muestras, se completó una “Ficha de muestreo” (Anexo 3), apuntando a recopilar la mayor cantidad posible de información sobre el brote, incluyendo desde información básica, como la especie, el estado de desarrollo, la mortalidad acumulada por IPN, y los signos clínicos específicos del grupo de peces que se está muestreando, entre otros. Además se fotografiaron los hallazgos de la necropsia del pez, intentando denotar los signos clínicos de la enfermedad.

Paralelamente a la toma de muestras se realizó el llenado de una “Encuesta epidemiológica” junto con el jefe de centro o el médico veterinario encargado del centro de cultivo, con el fin de recopilar toda la información productiva y sanitaria asociada al centro y la unidad de cultivo de los peces muestreados durante los últimos meses. (Anexos 4 y 5).

### **Análisis de muestras y aislamiento de virus**

Se comprobó que las muestras venían preservadas adecuadamente y cumpliendo con la cadena de frío, además de venir bien rotuladas y con la información clara con respecto al muestreo. Para comprobar la presencia/ausencia del virus IPN en las muestras, estas se sometieron a análisis de inmunofluorescencia por la técnica descrita en Espinoza & Kuznar (2002) y además se realizaron dos tipos de PCR en tiempo real, uno dirigido al segmento B (PCR VP1, química taqman) y otro al segmento A de virus (PCR VP2, química SYBR-Green) como se describe en Eissler et al. (2011). En conjunto con el diagnóstico de la presencia del virus, las muestras se examinaron para detectar la presencia del gen de referencia ELF1 (Moore et al. 2005) para determinar la calidad de la muestra de tejido. Además, todas las muestras que fueron recibidas en medio de cultivo se maceraron y se emplearon para inocular células CHSE-214, luego de comprobar un efecto citopático, los aislados fueron titulados y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los aislados forman parte del cepario que es requerido como resultado esperado del proyecto. Los virus que constituyen parte del cepario fueron re-aislados a lo menos una vez durante el desarrollo del proyecto para confirmar su actividad. Este procedimiento se realizará una vez cada seis meses para la mantención del cepario.

Detallando lo anteriormente señalado, para el ensayo de IFAT se utilizó el kit IPNV Fluorotest (GrupoBios). Brevemente, 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra fueron inoculados en una monocapa preconfluyente de células CHSE-214 cultivadas sobre un cubreobjeto de vidrio de 12 mm de diámetro. Luego de 16 h de infección a  $15^{\circ}\text{C}$ , las células fueron fijadas con metanol frío, lavadas con PBS e incubadas con los anticuerpos incluidos en el kit según las instrucciones del fabricante. Finalmente, las células fueron lavadas por última vez, montadas en portaobjetos utilizando solución de montaje Dako y observadas a través de un microscopio de epifluorescencia BX60 Olympus (aumento de 100X) equipado con filtro dicróico WIB.

Para los análisis moleculares, se realizó una extracción del RNA viral a 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra con el kit E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Total RNA Kit I (OMEGA bio-tek), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA total extraído se determinó por la medición de la

razón de la absorbancia a 260 nm sobre 280 nm usando un espectrofotómetro (MaestroNano, Maestrogen).

Las reacciones de PCR tiempo real fueron realizadas con el kit AgPath-ID One step RT-PCR y la sonda TaqMan MGB PROBE (qRT-PCR VP1) y con el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green (qRT-PCR VP2) siguiendo el procedimiento descrito por Eissler et al. (2011). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo con el equipo para PCR tiempo real System Step-One (Applied Biosystems), el que cuenta con una placa para 48 reacciones. Los partidores y sondas utilizados para cada una de las reacciones se muestran en la Tabla 1. Para asegurar que la contaminación sea estrictamente controlada, se realizó siempre un control negativo utilizando agua grado biología molecular en cada una de las etapas del proceso. Además se utilizó como control positivo de la reacción la cepa de referencia (UV/84). El qRT-PCR VP1 se realizó al mismo tiempo que el qRT-PCR ELF1.

Tabla 1. Partidores y sondas utilizados para las reacciones de RT-PCR en tiempo real y determinación del gen de referencia ELF1.

Partidores/ Sonda	Nombre	Secuencia	Posición del Amplicón	Región codificante
<b>TaqMan</b>				
Sonda	IPNV VP1	56FAM/TACATAGGC/ZEN/AAAACCAAAGGAGACAC/3IAB kFQ	Segmento B: 668- 820	VP1
Forward	VP1F	GTTGATMMASTACACCGGAG		
Reverse	VP1R	AGGTCHCKTATGAAGGAGTC		
<b>SYBR-Green</b>				
Forward	WB1	CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC	Segmento A: 20-225	VP2
Reverse	WB2	CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG		
<b>ELF1</b>				
Sonda		FAM- ATCGGCGGTATTGGAAC		
Forward		CCCCTCCAGGACGTTTACAAA		
Reverse		CACACGGCCACAGGTACA		

## Secuenciación de los aislados

Se realizó la caracterización molecular de los aislados obtenidos a medida que llegaban las muestras, completando un número mínimo para enviar a secuenciar. El procedimiento que se

realizó se describe a continuación. El RNA viral fue extraído directamente desde el tejido homogeneizado de los peces muestreados y a partir de los aislados provenientes del cultivo celular, de acuerdo a las instrucciones del fabricante con el kit E.Z.N.A.<sup>™</sup> Total RNA Kit I (OMEGA biotek). La concentración y pureza del RNA total extraído fue determinada mediante la medición de absorbancia a 260 nm y 280 nm usando el espectrofotómetro MaestroNano.

Se amplificó una región de la primera porción del gen que codifica la proteína VP2, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), con el equipo PCR Multigene (Labnet). Se mezclaron 3  $\mu$ L de ARN viral con los partidores A1F (5'-TGAGATCCATTATGCTTCCAGA-3') y A2R (5'-GACAGGATCATCTTGGCATAGT-3') (Blake *et al.* 1995) a una concentración final de 0,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ L del 2X Master Mix Brilliant III Ultra-Fast SYBR<sup>®</sup> Green QRT-PCR (Stratagene) a una concentración de 1  $\mu$ M, 0,8  $\mu$ L de RT/RNase block y 4,2  $\mu$ L de agua libre de ARNasas en un volumen total de reacción de 20  $\mu$ L. La reacción se desarrolló en base al siguiente perfil de temperaturas: 42°C por 30 min para la retrotranscripción, 95°C por 3 min para la inactivación de la retrotranscriptasa y activación de la polimerasa, 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturalización, 58°C por 30 s para hibridación y 72°C por 100 s para la elongación, y la extensión final a 72°C por 10 min.

Los fragmentos amplificados, de una longitud aproximada de 1180 pb, fueron verificados por medio de una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1%. Una vez detectada la banda específica, la purificación se realizó directamente a partir del volumen de la reacción de PCR de acuerdo a las instrucciones del fabricante usando el kit E.Z.N.A.<sup>®</sup> Cycle-Pure Kit (OMEGA biotek). El ADN obtenido para cada muestra fue eluido con 50  $\mu$ L de agua grado biología molecular.

Posteriormente se realizó un PCR anidado, con el fin de poder concentrar más el material genético de las muestras. Este segundo PCR consistió en amplificar un fragmento a partir del producto amplificado en la reacción anterior (1180 pb) en el mismo termociclador. Se mezclaron 1,5  $\mu$ L del producto PCR anterior con los partidores WB1 (5'-CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC-3') (Williams *et al.* 1999) y AIR (5'-GTCTCGTCCTCWAGBCGGACGTATG-3') (Tapia *et al.* 2015) a una concentración final de 0.5  $\mu$ M, 15  $\mu$ L de 2X DreamTaq Green PCR Master Mix (Fermentas) a una concentración final de 1  $\mu$ M y 10,5  $\mu$ L de agua libre de ARNasas en un volumen total de reacción de 30  $\mu$ L. La reacción se desarrolló en base al siguiente perfil de temperaturas: 95°C por 5 min para la activación de la ADN

polimerasa Taq, 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturalización, 60°C por 30 s para hibridación y 72°C por 45 s para la elongación, y la extensión final a 72°C por 10 min.

Los fragmentos amplificados de una longitud aproximada de 523 pb, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1%. Una vez diferenciadas las bandas, se cortaron y se transfirieron a tubos de microcentrifuga, para luego ser purificadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante usando el kit E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit (OMEGA bio-tek). El ADN obtenido para cada muestra fue eluido con 50 µl de agua grado biología molecular.

Duplicados purificados del producto PCR provenientes de los dos tipos de PCR realizados se secuenciaron en Macrogen Inc., Corea, usando un analizador de ADN modelo ABI3730XL (Applied Biosystems).

Las secuencias completas fueron obtenidas con partidores diseñados en el Laboratorio de Referencia para secuenciar cada uno de los segmentos completos A y B del virus IPN. El RNA viral fue extraído de la misma manera señalada anteriormente y amplificado para obtener cDNA en un PCR convencional Multigene (Labnet). Los segmentos A y B amplificados fueron purificados directamente siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el kit E. Z. N. A. ® Cycle Pure Kit (OMEGA bio-tek). El ADN obtenido para cada muestra fue eluido con 55 µl de agua grado biología molecular y enviado a secuenciar a MrDNA, TX, USA en un secuenciador masivo HiSeq system (Illumina).

### **Análisis bioinformático de las secuencias y epidemiología molecular**

Las secuencias obtenidas se analizaron bioinformáticamente, con el objeto de estudiar la epidemiología molecular del virus IPN. Dichas secuencias fueron editadas con el programa Geneious Pro 4.8.5 y Geneious R10, y posteriormente comparadas y alineadas en el programa Mega 7.0 (Kumar et al., 2016), con otras secuencias previamente publicadas de la proteína VP2 del virus IPN (Blake et al., 2001; Mutoloki y Evensen, 2011) y con aislados reportados para Chile por Mutoloki y Evensen (2011), Calleja et al., (2012) y Tapia et al., (2015), además de los 54 aislados ya secuenciados con los que cuenta el Laboratorio de Referencia. Se confeccionaron árboles filogenéticos con el programa Mega 7.0, en base a la composición de aminoácidos de las secuencias, utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) usando el modelo de sustitución distancia p. La validez estadística de los resultados obtenidos para cada árbol, se evaluó mediante el método estadístico Bootstrap con 1000 ciclos de iteraciones. A partir de la comparación directa

dentro del árbol resultante, se definieron los genogrupos a los que pertenecen los virus secuenciados en este trabajo.

Se determinó la existencia de factores de virulencia en las secuencias obtenidas, los cuales corresponden a los señalados por Santi et al. (2004), Song et al. (2005) y Bruslind & Reno (2000). Los dos primeros se basan en la presencia de una combinación específica de residuos de aminoácidos en las posiciones 217 y 221, correspondientes a Treonina 217 y Alanina 221, que señalaría a una cepa como virulenta. Adicionalmente, según lo propuesto por Song et al. (2005) en base a la presencia del residuo Prolina 217 y Alanina 221 o del residuo de aminoácido Treonina 221, se determinó si los virus secuenciados se clasifican en moderadamente virulentos o avirulentos respectivamente. Por otro lado, Bruslind & Reno (2000) catalogan a los virus en virulentos o moderadamente virulentos según el residuo presente en la posición 217, donde asocian un aislado virulento al residuo treonina en posición 217 y a un aislado menos virulento (moderadamente virulento) con el aminoácido alanina en esa misma posición.

### *METODOLOGÍA OBJETIVO 3*

El objetivo 3 se abordó utilizando un estudio epidemiológico de tipo observacional retrospectivo de Casos y Controles y de carácter voluntario, para la obtención de la información se aplicó encuestas epidemiológicas sobre IPN, diferenciadas en relación a la condición del centro con respecto a la enfermedad.

Además se agregó información proporcionada por el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) de eventos estresantes previos a la aparición del brote, los cuales se clasificaron en eventos de tipo ambiental, otras enfermedades, manejos sanitarios, manejos productivos y ataques de depredadores entre otros.

### **Tamaño de Muestra y Poder de la prueba para estudios de Casos y Controles**

De acuerdo al estudio y análisis de las prevalencia de centros y jaulas/estanques de agua dulce y mar se determinó el tamaño con el programa StatCalc Sample Size and Power de EpiInfo 7.0® para estudios de Casos y Controles. Se estableció una relación de 1:2, lo que significa que por cada centro Caso se analizarán 2 centros Controles. Para establecer el tamaño de la muestra se utilizó un 95% de confianza y un poder de 80%.

Se aplicó la siguiente formula:

$$n = \frac{\left[ z_{1-\alpha/2} \sqrt{c+1} p(1-p) + z_{1-\beta} \sqrt{c p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{c(p_2 - p_1)^2}$$

P1 factor de exposición casos=0,51

P2 factor de exposición control=0,21

OR=1,5

Se determinó un tamaño de muestra de 30 centros Casos y 60 centros Controles.

En función del cálculo de número de centros casos confirmados se estableció el número de centros a muestrear para el objetivo n° 2 para identificar y caracterizar las cepas virales presentes en las diferentes zonas del país y diferentes especies de cultivo, de esta manera se logra un 100 % de certeza (sensibilidad 100%) que los centros casos están infectados con el virus de IPN.

### **Metodología de recolección de la información**

La información se recoge por dos vías una es a través de Sernapesca y la otra por las empresas productoras. En el caso del Servicio Nacional de Pesca, éste recibe la información de los centros que presentan un brote de mortalidad de peces causado por IPNV por la vía de notificación obligatoria a través del sistema de fiscalización de la acuicultura (SIFA), así como información de la aparición de otras enfermedades que afectan a los centros productores que podrían participar como centros controles. La obtención de la información de los centros controles se produce por el reclutamiento voluntario de las empresas que quieran participar en el estudio, donde habitualmente colaboran aquellos que han tenido centro casos y se les ha hecho el estudio genómico del virus que afecta el centro.

Una vez identificados los centros ya sea como caso o control, se les aplica la pauta de criterio de inclusión que fue validada durante el estudio. Es así que se definen los Casos y Controles, como aquellos centros tanto de mar como de agua dulce que presenten las siguientes condiciones:

1) Definición y selección de los casos.

1.1. Centro caso: serán aquellos centros con una o más jaulas con peces con diagnóstico clínico y confirmado con técnicas de laboratorio qRT-PCR de un brote de IPNV.

1.2. Jaula caso: jaulas con peces con diagnóstico clínico de IPN con una mortalidad asociada superior a 0,02% semanal y confirmado con técnicas de laboratorio qRT-PCR.

2) Definición y selección de los controles.

2.1. Centros controles: serán centros de agua dulce y mar cuyas jaulas o estanques no presenten diagnóstico clínico o mortalidad asociados a IPNV o con mortalidades semanales menores a 0,02%.

2.2. Jaulas/estanques controles: jaulas con peces sin diagnóstico clínico de IPNV o con mortalidades semanales menores a 0,02%. Esto último dependerá del estudio retrospectivo de la enfermedad en centros de agua dulce y mar y por especie.

Por otro lado, en una primera instancia se estableció la realización de un análisis histórico de los centros controles donde se establecía que deberían por lo menos en los tres últimos años no presentar registros con eventos de brotes por IPNV, debido a las dificultades del reclutamiento de los centros controles y disminución del universo de centros de mar por el Bloom de algas se eliminó este criterio, estableciéndose que en el último año no presenten eventos de la enfermedad.

Cuando el centro está identificado y se obtiene la autorización para la toma de muestra (objetivo 2) o la autorización para participar como centro control, se procede al llenado de las encuestas que fueron diseñadas y validadas aplicadas y de acuerdo a su condición se establece el formato de encuesta; a) Encuesta centro caso agua mar, b) Centro caso agua dulce, c) Encuesta centro control agua mar, d) Centro control agua dulce.

Una vez de recibidas las encuestas son tabuladas en una planilla Excel para generar la base de datos.

Para caracterizar epidemiológicamente los centros casos y controles se hizo un análisis descriptivo de los diagnósticos de brotes de IPN. Además se realizaron pruebas de hipótesis, que serán paramétricas o no paramétricas según la evaluación de las distribuciones de cada variable analizada. Para las variables cuantitativas con distribución normal se aplicó el Test T de Student, en

el caso de variables no paramétricas el test de Rangos de Wilcoxon y de variables cualitativas se utilizó el test  $X^2$  y el test Exacto de Fisher.

Para la evaluación de los factores asociados con el riesgo y protectivos de la presentación de brotes a nivel de centros, se realizó un análisis de regresión logística y GLM, utilizándose un nivel de confianza del 95%. En esta etapa preliminar se analizó la información para la determinación de factores de riesgo a nivel general considerando dentro del modelo centros de agua dulce y de mar y como un segundo análisis, se generó un modelo diferenciando los sistemas productivos. Para el análisis estadístico epidemiológico se empleó el programa computacional SAS 2012 y R.

## PLANIFICACIÓN ACTIVIDADES FUTURAS

Las actividades se describen a continuación por objetivo, de acuerdo al Contrato de Investigación, Decreto exento n°269, 15 abril 2015, y la modificación a dicho contrato Resolución exenta N°1944 del 16/06/16. La carta Gantt actualizada se observa en la Tabla 2.

### Objetivo 1:

- Revisión de la información bibliográfica disponible nacional e internacional de IPN: esta actividad se da por terminada, se entrega junto a este informe toda la información recopilada, junto a la base de datos correspondiente.

### Objetivo 2:

- Concretar convenios empresas Salmoneras: Esta actividad ya se llevó a cabo en dos oportunidades y se da por cumplida, con una reunión reportada en el primer informe realizada el 1 de julio del 2015 y con reuniones llevadas a cabo los días 27 y 28 de enero del 2016 en Puerto Montt, reportadas en el segundo informe. Independiente de estas reuniones, se siguió en contacto vía telefónica y correo electrónico con las empresas, recibiendo ayuda concreta y directa de parte de dos empresas.
- Muestreo en terreno: Se extendió en cuatro meses más el plazo para la realización de los muestreos, hasta fines de noviembre del 2016, y se logró muestrear 26 centros que presentaron IPN durante la ejecución del proyecto.
- Evaluar avance muestreos en terreno: Esto fue evaluado en su debido tiempo, considerándose en consecuencia que el avance en el muestreo era pertinente para lograr los resultados esperados en relación a los objetivos planteados en el proyecto.
- Caracterización microbiológica, epidemiológica y molecular de los aislados virales: Esta actividad se ejecutó hasta fines noviembre del 2016, junto con el término en la recepción de los muestreos.
- Implementación y mantención de un cepario de virus IPN: Esta actividad se realizó hasta la recepción de las muestras y se seguirá con la mantención de los aislados virales de acuerdo a los estándares del Laboratorio de Virología como Laboratorio de Referencia hasta que el FIP lo requiera o de manera permanente. Producto de este proyecto se cuenta con 50 aislados obtenidos desde 26 centros.

- Secuenciación y análisis bioinformático: Esta actividad se realizó hasta diciembre del 2016. En este informe se presentan resultados de la secuenciación y análisis bioinformático de los 50 aislados de IPNV obtenidos durante la ejecución del proyecto.

### **Objetivo 3:**

- Diseño y validación de las encuestas epidemiológicas Sernapesca e Industria: Esta actividad ya fue realizada y reportada en el primer informe del proyecto.
- Recepción encuestas epidemiológicas e información de casos según semana epidemiológica (Sernapesca) y construcción base de datos: Esta actividad se realizó hasta enero del 2017, más allá del plazo contemplado en un comienzo, ya que no se alcanzó el número esperado de encuestas en el periodo previsto. Además, la base de datos se complementó con información proporcionada por Sernapesca.
- Descripción y análisis epidemiológico derivado de las encuestas epidemiológicas aplicadas: Esta actividad se realizó hasta marzo 2017.
- Análisis de los datos para la identificación de factores de riesgo y protectivos para la presentación de la enfermedad: Con la base de datos construida con los datos proporcionados en las encuestas epidemiológicas y por Sernapesca, se identificaron los factores de riesgo y proyectivos. Esto se realizó desde noviembre 2016 a marzo 2017.

### **Objetivos 1, 2 y 3:**

- Reuniones de coordinación técnica con la contraparte técnica: Se realizaron 4 reuniones (i.e., 08/05/15, 28/05/15, 27/11/15 y 13/01/16) con la contraparte técnica de Subpesca y Sernapesca. Estas reuniones tuvieron como objetivos principales la coordinación de los muestreos en terreno y la verificación del estado de avance del proyecto.
- Reuniones de estado de avance del proyecto: En las dos últimas reuniones realizadas 27/11/15 y 13/01/16, se evaluó el estado de avance del proyecto, en la reunión de noviembre del 2015 se resaltó la recepción de solo dos muestreos (resultados presentados en el primer informe) y en la reunión de enero debido al escaso avance en los muestreos, se decidió que era pertinente solicitar una extensión del plazo del proyecto. Lo cual se llevó a cabo y fue cumplido.
- Entrega primer informe de avance: Ya se cumplió con la entrega del primer informe de avance el 14 de septiembre del 2015.

- Entrega segundo informe de avance: Ya se cumplió con la entrega del segundo informe de avance el 17 de julio del 2016.
- Entrega pre-informe final: Ya se cumplió con la entrega del pre-informe final el 20 de enero del 2017.
- Entrega informe final: Este informe corresponde al informe final del proyecto.
- Elaboración material fotográfico que dará cuenta de las principales actividades del proyecto: Se recopiló material fotográfico durante la ejecución del proyecto, incluyendo el Taller de difusión, el cual se muestra en éste último informe. Ver Anexo 5 en el que se resume el material fotográfico recopilado durante la ejecución del proyecto y sección Taller de difusión.
- Elaboración resumen del proyecto en idioma inglés: Se presenta en este informe final.
- Taller de difusión: El taller de difusión se realizó el 26 de enero del 2017 en el Hotel San Luis, Puerto Montt.
- Elaboración de conclusiones y recomendaciones provenientes del taller de difusión: Se presentan en este informe final en la sección Taller de difusión.
- Elaboración publicación científica: Se presenta en este informe un manuscrito publicado: “Genotipificación y relación hospedador-especifica del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa en Chile”, cuyos autores son: Pamela Torres, Yoanna Eissler, David Tapia, Juan Carlos Espinoza, Juan Kuznar y otro enviado y aceptado con correcciones: “Inter laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile”, cuyos autores son: David Tapia, Yoanna Eissler, Juan Carlos Espinoza y Juan Kuznar (ver Anexo 6).

Tabla 2. Carta Gantt.

Actividades por Objetivo	2015										2016										2017				
	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A
<b>Objetivo 1:</b>																									
Revisión de la información bibliográfica disponible nacional e internacional de IPN	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
<b>Objetivo 2:</b>																									
Concretar convenios Empresas Salmoneras										x	x	x													
Muestreo en terreno					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Evaluar avance muestreos en terreno													x												
Caracterización microbiológica, epidemiológica y molecular de los aislados virales					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Implementación y mantención de un cepario de virus IPN					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Secuenciación y análisis bioinformático					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
<b>Objetivo 3:</b>																									
Diseño y validación de la encuestas epidemiológicas Sernapesca e industria.				x	x																				
Recepción encuestas epidemiológicas e información de casos según semana epidemiológica (SERNAPESCA) y construcción base de datos.										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Descripción y análisis epidemiológico derivados de las encuestas epidemiológicas aplicadas.										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Análisis de los datos para la identificación de factores de riesgo y protectivos para la presentación de la enfermedad																				x	x	x			
<b>Objetivos 1, 2 y 3</b>																									
Reuniones de coordinación técnica con la contraparte técnica	x			x	x					x															
Reuniones de estado de avance del proyecto									x	x															
Entrega primer informe de avance						x																			
Entrega segundo informe de avance																x									
Entrega pre-informe final																						x			
Entrega informe final																							x		
Elaboración material fotográfico que dará cuenta de las principales actividades del proyecto				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Elaboración resumen del proyecto en idioma inglés																							x		
Taller de difusión																							x		
Elaboración de conclusiones y recomendaciones provenientes del taller de difusión																							x	x	
Elaboración publicación científica													x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

## RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados por objetivo, obtenidos durante la ejecución del proyecto.

### *RESULTADOS OBJETIVO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

Se presenta a continuación la revisión bibliográfica junto con las referencias catalogadas de acuerdo a cuatro temas principales.

#### **Enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa**

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) es una enfermedad viral, que afecta principalmente a los primeros estadios de peces salmónidos que son mantenidos en condiciones de producción intensiva (OIE 2006). Aunque todas las fases de desarrollo de los salmónidos son susceptibles a la enfermedad, esta se asoció inicialmente a los salmónidos de cultivo en estadio de desarrollo de alevín, ocasionando mortalidades de incluso el 100% de la población de peces (McAllister 1983); pero posteriormente, a mediados de la década del 80', comenzaron a reportarse brotes de la enfermedad en centros de agua de mar, afectando a peces en proceso de esmoltificación, e incluso adultos (Skjesol 2009). Trabajos experimentales con post-smolt han comprobado el efecto de la transferencia de estos desde agua dulce a agua de mar (Jarp et al. 1994, Rønneseth et al. 2007). Jarp et al. (1994) estimaron la mortalidad acumulada al primer mes de transferencia a agua de mar de post-smolt de la especie *Salmo salar*, registrando brotes en el 40% de los sitios estudiados, con mortalidades significativas. Por otro lado, en el trabajo de Rønneseth et al. (2007) post-smolt de salmón del Atlántico fueron transferidos a agua de mar, para posteriormente exponerlos al virus mediante inyección intraperitoneal y baños. Paralelamente se realizó el mismo desafío con virus IPN, pero en alevines parr en agua dulce. En el primer grupo se registraron altas mortalidades (63%) desde la primera y segunda semana post desafío, y por el contrario, en los estanques con alevines parr no se registró mortalidad. Esta mortalidad aguda encontrada en post-smolt, posterior a la transferencia a agua de mar, se asocia principalmente con el grado de estrés que ocasiona el paso de agua dulce a agua de mar (Jarp et al. 1994, Roberts & Pearson 2005), y que va de la mano con los cambios fisiológicos e inmunológicos por los que atraviesa el pez en la etapa de aclimatación en agua de mar (Rønneseth et al. 2007).

Las especies típicamente afectadas por esta enfermedad son la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), la trucha común (*Salmo trutta*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y varias especies del género *Oncorhynchus* spp., entre los que se cuenta el salmón Coho

(*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (OIE 2006). La susceptibilidad a la enfermedad puede deberse a variados factores; está documentado que la trucha de arroyo es más sensible al virus IPN que la trucha arcoíris y el salmón del Atlántico (McCull et al. 2009), pero aun así estas 3 especies son las más afectadas por la enfermedad (Fridholm 2008). De acuerdo a Skjesol (2009), además del manejo sanitario y la bioseguridad, un componente significativo que determina si una población de salmónidos desarrolla la enfermedad es la interacción entre el hospedador, el patógeno y el ambiente. Factores como la especie, edad, condición inmunitaria y fisiológica del hospedador; la carga viral en el agua, virulencia de la cepa; temperatura y propiedades químicas del agua, entre otros, son importantes determinantes (Skjesol 2009).

La enfermedad IPN en un comienzo fue descrita en las Provincias Marítimas de Canadá por M'Gonigle (1941), bajo el nombre de enteritis catarral aguda, y se atribuía su desarrollo a factores nutricionales, ocasionando altas mortalidades en juveniles de la especie salmonídea *Salvelinus fontinalis*. Posteriormente, Wolf et al. (1960) presentarían hechos que demostrarían la etiología viral de esta enfermedad. Ya a mediados de los años 1960, y durante la década del 70' y 80', hubo continuos reportes de la enfermedad en diferentes sectores de Norteamérica (Estados Unidos y Canadá), Sudamérica (Chile), Europa (Italia, Dinamarca, Suecia, Noruega, Inglaterra, Escocia, Francia, Alemania, entre otros), Asia (Japón, Corea del Sur, Taiwan, Tailandia y China) y África (Sudáfrica) (Reno 1999); (Bragg & Combrink 1987); (McAllister & Reyes 1984). La enfermedad se ha diseminado ampliamente en estos continentes, salvo en Oceanía, ya que en OIE 2006 informan que esta región es la única que se mantiene libre de la enfermedad. No obstante, McCowan et al. (2015) aporta antecedentes sobre el aislamiento del virus a partir de un episodio de mortalidad de alevines de trucha arcoíris, lo que podría ser atribuible al primer indicio de la presencia de la enfermedad en Australia.

En Chile, el primer reporte de la presencia de la enfermedad se remonta al año 1984, donde a partir de un criadero de truchas Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) asintomáticas se aisló el virus causante de la necrosis pancreática infecciosa, lo que además constituyó la primera evidencia de IPNV en Sudamérica (McAllister & Reyes 1984). Estos autores sugirieron que la introducción de este agente infeccioso fue a partir de ovas provenientes de Norteamérica, y esta misma fuente de origen del patógeno fue compartida por Espinoza et al. (1985). La libre circulación de ovas, que en su momento colaboró en acelerar el crecimiento de la industria salmonera en Chile, contribuyó además a la introducción de enfermedades debido a la transmisión de patógenos a partir de ovas importadas infectadas (Pinto et al. 2003). Registros en el trabajo realizado por Campalans et al. (2002) revelan

reportes en Chile desde 1970 de enfermedades bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias en salmónidos, que ocasionaron altas mortalidades en peces de cultivo, y entre estas se encontró la Necrosis Pancreática Infecciosa. En los años 90', se obtuvieron constantes registros de la presencia del virus por parte de los laboratorios que participan en el programa de vigilancia del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), lo que indicaba su amplia diseminación en el país (Campalans et al. 2002). En 1996, la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Subpesca) se ocupó oficialmente de la regulación, en términos sanitarios, de la importación de ovas, mediante el Decreto Exento N°75 el cual "Determina Certificados Sanitarios y otros Exigibles para la Importación de Especies Hidrobiológicas", y señala que la Autoridad Oficial del país de origen de las especies salmónidas a importar, deberá certificar que estas se encuentran libres de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa, entre otras. Posteriormente, en 1998 Subpesca instauró exigencias de certificación más estrictas a causa de la cantidad de enfermedades detectadas en los cultivos mundialmente, lo que queda reflejado en el Decreto N°480 "Exigencias Complementarias de Certificación Sanitaria para la Importación de Ovas de Especies Salmónidas".

En el año 2014, la situación sanitaria en Chile refleja que del total de los diagnósticos positivos para agentes patógenos, en centros de agua de mar y agua dulce, el virus IPN representa el 38,2% y 34,3% respectivamente. El desglose por especie indica que la especie *Salmo salar* es la que acumuló mayor cantidad de diagnósticos (23,95%), por sobre *Oncorhynchus mykiss* (12,19%) y *Oncorhynchus kisutch* (2,10%). Lo mismo ocurrió en el caso de los centros de agua dulce, ya que *Salmo salar* representó el 28,87% de los diagnósticos, seguido por *Oncorhynchus kisutch* (3,25%) y *Oncorhynchus mykiss* (2,19%) (SERNAPESCA 2014).

### ***Manifestaciones Clínicas e Histopatología***

La enfermedad se presenta en especies salmonídeas, donde el grado de susceptibilidad al virus puede variar de una especie a otra, pudiendo incluso generar distintos signos clínicos (Fridholm 2008). Aun así, en términos generales, el IPN se caracteriza por causar diversos cambios conductuales e importantes lesiones, tanto internas y externas como a nivel histológico. En la Tabla 3 se describen los distintos signos clínicos asociados a IPN recopilados en la literatura (Munro & Midtlyng 2011; Maret 1997; Roberts & Pearson 2005; Vega et al. 2011). Hasta el momento no se han identificado signos patognomónicos para la enfermedad, no obstante, dentro de los signos clínicos más comunes se pueden encontrar: anorexia, ataxia, hiperventilación, oscurecimiento de la piel,

hinchazón abdominal exoftalmia, palidez de las branquias y hemorragias en áreas ventrales y aletas, entre otros (Figuras 3 y 4), (Rodríguez et al. 2003; Roberts & Pearson 2005).

Tabla 3. Signos clínicos asociados a una infección por virus IPN.

<b>Signos en literatura</b>	
Oscurecimiento piel	Intestino con exudado catarral
Hemorragias petequiales en zona superficial ventral y aletas	Sustancia mucosa en el tracto digestivo
Branquias pálidas	Hemorragias petequiales en el tracto digestivo
Exoftalmia	Bazo pálido
Hígado pálido	Riñón pálido
Hígado amarillo	Corazón pálido
Congestión en hígado	Sistema digestivo sin contenido alimenticio
Hemorragias petequiales en tejido graso pilórico	Ascitis en las vísceras
Ciegos pilóricos con hemorragias petequiales	Hinchazón abdominal
Lesiones en mucosa intestinal	Exudado blanco amarillo en el ano



Figura 3. Alevines de truchas infectadas con virus IPN. Presentan abdomen distendido, piel oscura y exoftalmia.

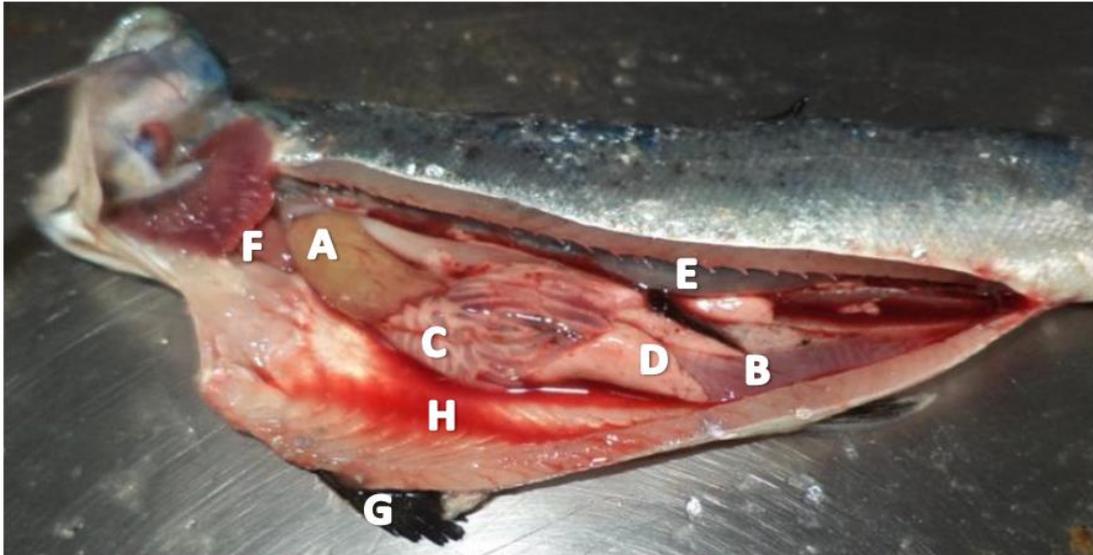


Figura 4. Necropsia de pez en donde se observan algunos de los signos clínicos asociados a IPN. A) Hígado amarillo; B) Intestino congestivo; C) Ciegos pilóricos congestivos; D) Hemorragias petequiales en grasa visceral; E) Vejiga natatoria inflamada; F) Corazón pálido; G) Aletas raídas; H) Ascitis hemorrágica.

La enfermedad puede ser muy severa. En un ensayo controlado en laboratorio, se infectaron por inmersión 50 alevines de truchas Arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), utilizando una densidad de 1g de pez por 50 ml de agua. Tras una semana de haber sido infectados, el 80% de los peces comenzaron a mostrar los signos clínicos de la enfermedad (Kirsinger et al. 1999).

A nivel histopatológico, se observa necrosis focal en las células de los acinos e islote del páncreas, y en el hígado (Roberts & Pearson 2005). Además, se describen diferencias entre algunos salmónidos, por ejemplo, en truchas arcoíris las lesiones típicas relacionadas a la enfermedad, son la necrosis del tejido acinar del páncreas y el exudado catarral del intestino. En el caso de salmón del atlántico se ha observado áreas de necrosis focalizadas o generalizadas en el hígado que, además se observa pálido y muy frágil al tacto, necrosis en el tejido hematopoyético del riñón (Roberts & Pearson 2005; Smail et al. 2006), algunos de estos hallazgos se muestran en la Figura 5. Además, existe evidencia de salmones infectados con aislados de virus IPN que no expresan la proteína VP5 (que tiene actividad anti apoptótica) que presentan hepatocitos en estado apoptótico. Esta respuesta estaría desencadenada por el sistema inmune innato del pez más que por el virus IPN (Noguera & Bruno 2010).

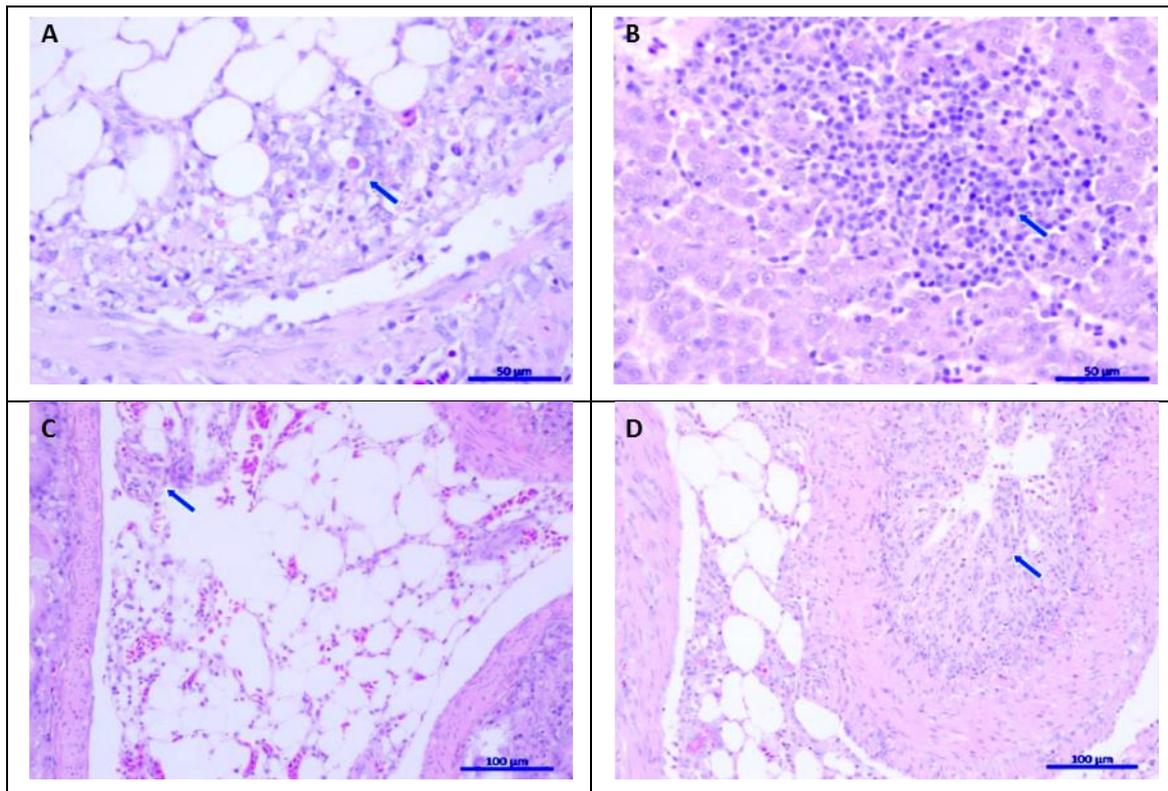


Figura 5. Hallazgos histopatológicos relacionados con IPN (†). Tinción con hematoxilina-eosina. A) Ciegos pilóricos: Atrofia del páncreas exocrino, con tejido conectivo residual y congestión de tejido adiposo peripancreático; B) Ciegos pilóricos: Atrofia de vellosidades en mucosa cecal; C) Páncreas: Necrosis y apoptosis en páncreas exocrino; D) Hígado: Necrosis de hepatocitos e infiltrado leucocitario mononuclear.

Las lesiones histológicas comunmente asociadas a infección por virus IPN, recopiladas a partir de la literatura (Munro & Midtlyng 2011; Maret 1997; Roberts & Pearson 2005; Vega et al. 2011), se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Signos histológicos asociados a una infección por virus IPN.

<b>Signos en literatura</b>
Necrosis en tejido hepático y pérdida de la arquitectura celular en el hígado
Infiltrado inflamatorio en el hígado
Necrosis en celulas acinares del páncreas e islotes de Langerhans en páncreas
Remanentes de estructura de sostén y tejido adiposo del páncreas
Necrosis en tejido adiposo peripancreático
Infiltrado de celulas mononucleares en páncreas
Necrosis de la mucosa intestinal y cecal
Enteritis catarral en intestino y ciegos pilóricos
Infiltración de células mononucleares en intestino y ciegos pilóricos
Incremento gradual de melanomacrófagos en riñón
Necrosis en el tejido hematopoyetico del riñón
Signos de necrosis y degeneración de tejido adiposo intra-abdominal

## Agente etiológico

El virus de la necrosis pancreática infecciosa, virus IPN o IPNv, es el agente etiológico causante de la enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa. Pertenece a la familia Birnaviridae, la cual se compone de 4 géneros: *Avibirnavirus*, *Entomobirnavirus*, *Blosnavirus* y *Aquabirnavirus*, siendo la especie tipo de este último grupo (Lvov et al. 2015; Nobiron et al. 2008). Los virus miembros de esta familia se caracterizan por presentar un genoma bisegmentado de ácido ribonucleico de doble cadena (dsRNA) (Dobos 1995).

A pesar de que se han encontrado virus muy cercanos al virus IPN en una variedad de organismos acuáticos (anguilas, bivalvos, ostras, peces, entre otros), estos corresponden a birnavirus acuáticos, y solo se utiliza el término virus IPN cuando el agente es aislado o causa sintomatología clínica en salmónidos (Munro & Midtlyng 2011).

Las partículas virales presentan una estructura externa (o cápside) de forma icosaédrica de un promedio de 60-65 nm de diámetro, que carece de envoltura lipídica (Duncan et al. 1987; Fridholm 2008). De acuerdo a observaciones realizadas mediante microscopia electrónica, la cápside se encuentra conformada por 92 capsómeros (Kelly & Loh 1972). El coeficiente de sedimentación de la partícula viral es de 43 S y su peso molecular  $55 \times 10^6 \pm 7 \times 10^6$  Da, del cual un 8,7% corresponde a material genético y lo restante a proteínas de la cápside viral (Dobos 1977).

El genoma del virus consta de dos segmentos lineales de dsRNA, denominados segmento A y B, con un peso molecular de  $2,5 \times 10^6$  and  $2,3 \times 10^6$  respectivamente (Dobos 1977). El primer segmento corresponde al más grande, con un tamaño de aproximadamente 3100 pb y el segmento B de 2784 pb (Blake et al. 2001). El segmento A posee 2 marcos de lectura abierta (ORF) superpuestos: el más grande codifica para una poliproteína de 106 kDa en el orden NH<sub>2</sub>-pVP2-NS-VP3-COOH y el más pequeño codifica para un polipéptido rico en arginina, conocido como VP5. Por otro lado, el segmento B codifica para el polipéptido VP1.

Dobos (1995), en su descripción molecular del virus, señaló las funciones de cada polipéptido: la proteína pVP2 atraviesa una proteólisis durante la maduración del virus y forma a su precursora, la proteína VP2 de 54 kDa, la cual constituye el componente estructural principal de la cápside del virión, representando el 62% de la masa proteica del virus. La proteína VP2 estimula la producción de anticuerpos específicos y participa en la unión virus-célula. VP3 es una proteína estructural interna del virus de 29 kDa y representa el 34% de la masa proteica del virus. A pesar de estar contenida dentro de la cápside, parte

de ésta se encuentra expuesta a la superficie. Además, actúa como ribonucleoproteína al unirse su extremo C-terminal con el ARN viral (Maraver et al. 2003). El polipéptido no estructural NS de 27 kDa, se sugiere tiene una función proteolítica reconociendo las uniones pVP2/NS y NS/VP3 (Duncan et al. 1987, Dobos 1995). La proteína VP5, de 17 kDa, tiene una función poco clara, pero es posible encontrarla en la fase inicial de la multiplicación viral (Santi et al. 2005). Finalmente, el polipéptido VP1, de 94 kDa, representa el 4% de la masa proteica del virus y corresponde a la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Esta proteína se encuentra presente en dos formas: como un polipéptido libre o unido covalentemente al extremo 5' de los dos segmentos del ARN genómico (VPg) (Dobos 1995, Song et al. 2005).

### ***Clasificación y Distribución***

La primera vez que se aisló el virus IPN fue en 1957 en Estados Unidos y la cepa en cuestión fue catalogada como VR-299 (Hill & Way 1995). Con el tiempo continuaron apareciendo aislados de birnavirus acuáticos en diferentes zonas de Norteamérica y Europa, y para señalarlos como virus IPN se realizaron ensayos de neutralización cruzada con antisuero de ratón anti VR-299, hasta que comenzaron a identificarse variantes antigénicas de la primera cepa aislada. Posteriormente, Underwood et al. (1977), mediante un procedimiento estandarizado de neutralización cruzada, evidenció la presencia de 4 serotipos antigénicamente diferentes: VR-299, Sp, Ab y Tellina, correspondiendo los tres primeros a virus IPN. Continuamente, diferentes autores aseguraban la aparición de serotipos diferentes o se observaban errores y contradicciones entre los estudios, lo que hizo evidente la necesidad de tener una metodología estandarizada para realizar la serotipificación. El primer trabajo que propuso esta metodología, y la primera nomenclatura para clasificar serológicamente a los birnavirus acuáticos, fue el de Hill & Way (1995). Estos autores realizaron pruebas de neutralización cruzada con antisuero de ratón, en un total de 196 birnavirus aislados de peces, moluscos y crustáceos de agua dulce y salada, procedentes de Norteamérica y Europa. Los resultados reflejaron una división en dos grandes serogrupos, A y B, y una subdivisión en 9 serotipos del grupo A: West Buxton (A1), Sp (A2), Ab (A3), He (A4), Te (A5), Can1 (A6), Can2 (A7), Can3 (A8) y Jasper (A9); y en el caso del serogrupo B, este solo es representado por el serotipo TV-1 (Tellina). Posterior a esto, John & Richards (1999) sugirieron el tercer serogrupo, el C, compuesto solo por el serotipo BSNV aislado del pez *Channa lucius*, y tiempo después, Dixon et al. (2008) propusieron el cuarto serogrupo, el D, compuesto por 2 serotipos, D1 y D2, aislados de los peces *Oxyeleotris marmorata*, *Pterophyllum scalare*, *Colisa lalia* y *Microgeophagus ramirezi*.

Otra técnica que ha sido utilizada para serotipificar aislados es el ensayo con anticuerpos monoclonales. Caswell-Reno et al. (1989) prepararon un panel con anticuerpos monoclonales sintetizados en ratones (MAb), utilizando 5 anticuerpos previamente descritos y 6 desarrollados por ellos. Se utilizaron una variedad de 28 aislados para realizar el ensayo de inmunodot, entre los que se encontraban los serotipos de referencia (WB, Sp, Ab, He, Te, Can1-3 y Jasper). A raíz de los resultados obtenidos, los autores sugirieron que el ensayo puede utilizarse para una serotipificación preliminar de miembros de los serotipos WB, Sp y Ab, ya que obtuvieron patrones únicos al observar la reacción con todos los MAb. También, Tarrab et al. (1993) realizaron una caracterización antigénica del serogrupo A. Ellos utilizaron 3 paneles de MAb (el primer grupo contra el serotipo A1, el segundo contra A2 y el tercero contra A9), y un total de 12 aislados para el ensayo inmunodot. Los resultados mostraron que el virus IPN es muy heterogéneo y contiene gran variabilidad de sitios antigénicos, algunos conservados y otros muy variables. Los MAb mostraron una mayor uniformidad antigénica entre las cepas europeas en comparación con las americanas lo que sugiere que los serotipos europeos son anteriores a los norteamericanos.

En la actualidad, para clasificar a los birnavirus acuáticos, se utilizan mayormente técnicas moleculares que conllevan a una secuenciación del genoma del virus o parte de él (Heppell et al. 1992; Lee et al. 1996; Blake et al. 2001; Cutrín et al. 2004; Cutrín et al. 2005; Nishizawa et al. 2005; Vardic et al. 2007; Akhlaghi & Hosseini 2007; Bain et al. 2008; Guerrero et al. 2008; Joh et al. 2008; Romero-Brey et al. 2009; Ruane et al. 2009; Barrera-Mejía et al. 2010; Davies et al. 2010; Mladineo et al. 2011; Glenney et al. 2012; Dadar et al. 2013; Dadar et al. 2014; Parmaksiz et al. 2014; Salgado-Miranda et al. 2014; Ruane et al. 2015; Mohr et al. 2015; McCowan et al. 2015).

El trabajo de Blake et al. (2001), constituyó la primera reconstrucción filogenética de birnavirus acuáticos utilizada como referencia para clasificar grupos genéticos de estos virus. Estos autores llevaron a cabo una Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR) con 7 pares de partidores con el fin de amplificar varios fragmentos de ADN complementario que abarcaran por completo el ORF más grande del segmento A. Se utilizaron 28 aislados de una variedad de birnavirus acuáticos presentes en peces (perca, trucha, salmón, entre otros) y moluscos bivalvos (almeja, ostra y *Tellina* sp.) y se determinaron las secuencias deducidas de nucleótidos y aminoácidos de todo el ORF (2904 pb) y la secuencia del sector codificante de VP2 (1611 pb). Posterior a esto los autores construyeron un árbol filogenético basado en la región codificante de VP2 que demostró la presencia de 6 genogrupos y 4 genotipos dentro del genogrupo 1. El genogrupo

1 reúne la mayoría de las cepas de origen Norteamericanas (U.S.A. y Canadá); el genogrupo 2 se encuentra compuesto por cepas canadienses; al genogrupo 3 pertenecen cepas europeas y asiáticas (Dinamarca, Japón y Taiwán); el genogrupo 4 está conformado por cepas europeas y americanas (Canadá e Inglaterra); el genogrupo 5 agrupa la mayoría de las cepas europeas y una asiática (Dinamarca, Noruega, Francia, Inglaterra y Tailandia) y el genogrupo 6 solo se encuentra conformado por un aislado proveniente de Alemania. Esta clasificación en genogrupos realizada por Blake et al. (2001) se correlacionó con las serotipificaciones previas de los aislados (Caswell-Reno et al. 1986, Hill & Way 1995) (ver Tabla 5). Posterior a esta clasificación, Nishizawa et al. (2005) amplificaron y secuenciaron parte del genoma del segmento A, correspondiente a la región de unión de VP2/NS de un total de 14 aislados japoneses: 6 aislados de virus IPN y 8 aislados de birnavirus acuáticos. Para efectos de comparación se utilizaron 79 aislados de Aquabirnavirus y se realizó una reconstrucción filogenética. El resultado mostró un grupo de aislados japoneses separado de los 6 genogrupos conocidos, por lo que los autores postularon un séptimo genogrupo compuesto únicamente por aislados japoneses. Más recientemente, Mohr et al. (2015), analizaron secuencias de aislados australiano entre 1998 a 2013, provenientes de salmón del Atlántico y trucha Arcoíris de cultivo en agua de mar. La mayoría de los aislados derivan de muestreos por los programas de vigilancia sanitaria, pero desde el 2011 que se obtuvieron aislados a partir de poblaciones de trucha Arcoíris que presentaron mortalidades. Además, uno de estos aislados, VTAB, proviene de mortalidades de juveniles de trucha arcoíris, en agua dulce, y difiere genética y filogenéticamente de los restantes aislados australianos (McCowan et al. 2015). Mohr et al. (2015) comparó 15 aislados australianos, con el objetivo de detectar algún cambio molecular que estuviera contribuyendo a aumentar la patogenicidad del virus. Para obtener estas secuencias se valieron de la tecnología en Secuenciación de Última Generación (NGS). Primero, la retrotranscripción y amplificación del genoma del virus se realizó mediante dos técnicas: PCR Aleatorio o RT-PCR con partidores específicos. Una vez analizadas las secuencias de los aislados y compararlas, determinaron que entre los virus aislados de brotes y lo que no, no diferían mayormente y claramente todo pertenecían al genogrupo 5, salvo uno (VTAB). Este último aislado mostró ser diferente a los 14 aislados restantes, y en base a las diferencias observadas en el análisis filogenético de una región de 1344 pb de VP2, los autores propusieron que este representaría a la cepa tipo de un Genogrupo 8.

Tabla 5. Clasificación de aislados birnavirus acuáticos mediante seroneutralización por (Hill & Way 1995) y análisis genómico (Blake et al. 2001) (Fuente: Modificado tabla de Munro & Midtlyng (2011)).

<b>Nomenclatura</b>	<b>Serotipos (Hill &amp; Way 1995)</b>	<b>Genogrupo (Blake et al. 2001)</b>
<b>WB</b>	A1	1
<b>Sp</b>	A2	5
<b>Ab</b>	A3	3
<b>He</b>	A4	6
<b>Te</b>	A5	4
<b>Can. 1</b>	A6	4
<b>Can. 2</b>	A7	2
<b>Can. 3</b>	A8	2
<b>Jasper</b>	A9	1
<b>TV-1</b>	B1	*N.d.

\*N.d. No determinado

Bain et al. (2008), Vardic et al. (2007), Akhlaghi & Hosseini (2007), Guerrero et al. (2008), Ruane et al. (2009), Mladineo et al. (2011), Glenney et al. (2012), Salgado-Miranda et al. (2014), Gürçay et al. (2014) y Ruane et al. (2015) realizaron secuenciaciones parciales del gen VP2 para clasificar al virus IPN. Los primeros autores secuenciaron un fragmento de 1180 pb de VP2 de 17 aislados de hospedador *Salmo salar* de cultivo, 17 de peces silvestres y 6 aislados de virus IPN desde el ambiente cercano al centro de cultivo. Para determinar genogrupos utilizaron las cepas de referencia del trabajo de Blake et al. (2001). De los 36 aislados escoceses, 34 resultaron pertenecer al genogrupo 5 y dos al genogrupo 3. El trabajo de Akhlaghi & Hosseini (2007) constituye el primer registro de la detección de virus IPN en alevines de trucha arcoíris en Irán. Estos autores secuenciaron un fragmento de 224 pb de un aislado proveniente de truchas moribundas, y al efectuar la reconstrucción filogenética, junto con aislados reportados en otros trabajos, se encontró semejante a la cepa de referencia Ab, perteneciente al Genogrupo 2. En Croacia, los autores Mladineo et al. (2011) secuenciaron un fragmento de 359 pb de la secuencia que codifica para VP2, a partir de virus aislado de controles clínicos de alevines de trucha arcoíris. El análisis filogenético determinó que este aislado presentaba gran similitud con un aislado croata y otro español, pertenecientes al Genogrupo 5, lo que aporta evidencias para suponer un origen europeo de los aislados croatas. Esta misma agrupación en Croacia se observó en el trabajo de Vardic et al. (2007). Ellos analizaron la secuencia de VP2/NS a partir de un aislado proveniente de un alevín de trucha arcoíris infectada con virus IPN. El aislado mostro una alta identidad con aislados franceses e ingleses, parte del Genogrupo 5. Ruane et al. (2009) obtuvieron un total de 55 aislados de virus IPN a partir de las especies *Salmo*

*salar* de cultivo y silvestre, y *Salmo trutta* silvestre, provenientes de Irlanda. Secuenciaron un fragmento de 1100 pb de VP2 y realizaron un análisis filogenético, incluyendo las cepas de referencia propuestas por Blake et al. (2001), en donde resultaron todos los aislados irlandeses pertenecientes al genogrupo 5. Además, hallaron evidencias de la formación de dos subgrupos dentro del genogrupo 5: al subgrupo 1 pertenecieron aislados provenientes de reproductores y peces producidos dentro de Irlanda, y el subgrupo 2 estuvo compuesto principalmente por aislados provenientes de salmones importados. En el trabajo de Ruane et al. (2015), se analizaron 54 aislados provenientes de Irlanda entre 1993 y 2013 (salmón del Atlántico, trucha arcoíris y trucha alpina), y aislados de otras regiones geográficas como referencia, incluyendo los del trabajo de Blake et al. (2001). Se secuenció un fragmento de 529 pb, y la reconstrucción filogenética clasificó a la mayoría de los aislados irlandeses en el genogrupo 5 y solo 3 aislados pertenecieron al genogrupo 3. En este trabajo se vuelven a encontrar los subgrupos reportados por Ruane et al. (2009). En esta oportunidad recalcan el hecho de que los brotes infecciosos son atribuidos al subtipo 2, el cual comenzó a ser reportado posterior al año 2003, junto con la aparición de los primeros brotes graves de la enfermedad. En el trabajo de Gürçay et al. (2014), amplificaron un fragmento de 206 pb del gen que codifica para la proteína VP2, a partir de virus IPN aislado de fluido ovárico de trucha arcoíris. Posteriormente se comparó filogenéticamente con aislados provenientes de diferentes partes del mundo, resultando clasificado en el Genogrupo 5. Los resultados sugieren que el origen de IPNV en Anatolia, Turquía, se remonta a la introducción de ovas desde Noruega, Francia, Dinamarca, Taiwan, España y América. Glenney et al. (2012) aislaron un virus desde fluido ovárico de salmón del Atlántico. Secuenciaron toda la región codificante de la proteína VP2, para posteriormente construir 3 árboles filogenéticos: con la poliproteína pVP2-NS-VP3, VP2 y VP5. En todas las reconstrucciones filogenéticas realizadas comparando cepas de otras partes del mundo, el aislado obtenido fue clasificado en el Genogrupo 4. En el caso del trabajo de Guerrero et al. (2008), se secuenció un fragmento de 800 pb de VP2 a partir de 1 aislado de trucha arcoíris proveniente de una granja de cultivo en México. Se utilizaron cepas de referencia de los 7 genogrupos conocidos, siendo clasificado este aislado mexicano en el genogrupo 1. Posteriormente en México, Salgado-Miranda et al. (2014) secuenciaron el gen que codifica para la proteína VP2, a partir de 8 aislados obtenidos de trucha arcoíris de diferentes estados del país. Una vez obtenido el fragmento, este se comparó filogenéticamente con otros aislados reportados de diferentes orígenes (Norteamérica, Europa, Asia, entre otros), encontrándose su pertenencia al Genogrupo 1. Adicionalmente, sugirieron la conformación de un nuevo linaje mexicano de virus IPN, debido a la tendencia de estos a agruparse y al alto porcentaje de identidad exhibido. Recientemente, Ortega et al. (2016)

realizaron un estudio de la distribución y prevalencia del virus en ese país. Los datos corresponden a un período de 13 años de estudio y se confirmó que el virus presente está estrechamente relacionado con la cepa americana VR-299, y se encuentra diseminado en 7 de los 8 estados que cultivan truchas en ese país. Una sugerencia de los autores es la presumible introducción del virus a través de la importación de ovas, ya que la mayoría de éstas provienen desde los Estados Unidos.

En el trabajo de Cutrín et al. (2005), se ha demostrado que el virus puede ser detectado en muestras de sangre. Los investigadores aplicaron tres metodologías: RT-PCR, Hibridación por Southern blot, y PCR anidado, además de un aislamiento del virus desde los leucocitos del pez, en un ensayo diseñado para la detección del IPNV en reproductores, pues son ellos una importante fuente de virus. Los resultados demostraron que, la técnica RT-PCR es muy sensible para detectar el virus desde peces en estado portador. Un 21.9% de los peces muestreados fueron considerados portadores asintomáticos utilizando esta técnica. Al utilizar el método de la hibridación por Southern blot para confirmar los casos positivos, dado que aparecían bandas inespecíficas en los geles de agarosa, no solo confirmó estos casos, si no que incrementó el número de peces detectados en el estado portador. Esto confirmó que el RT-PCR estaba operando en el límite de su capacidad de detección, por lo que se utilizó la técnica de PCR anidado para mejorar esta sensibilidad, superando tanto la hibridación como el RT-PCR. El aislamiento del virus desde peces portadores es posible, pero es mucho menos sensible que el PCR anidado y RT-PCR, particularmente en este trabajo solamente en 5 de un total de 15 muestras de sangre fue posible aislar el virus, el cual fue posteriormente identificado como Dry Mills (Genogrupo I). El segmento B también ha sido utilizado para este tipo de clasificación. (Joh et al. 2008) utilizaron 7 pares de partidores para amplificar fragmentos que abarcaron todo el ORF que codifica para la proteína VP1, utilizando un aislado proveniente del pez *Syngnathus schlegeli*. Posterior a la amplificación, clonaron los fragmentos, para luego secuenciarlos. Los autores utilizaron 20 cepas provenientes del GenBank entre las que se encontraban las cepas de referencia Sp, WB y Jasper. La reconstrucción filogenética arrojó 5 grupos genéticos, donde WB y Jasper correspondieron al genogrupo 1, y Sp se encontró en un grupo diferente, señalado como genogrupo 2. El virus aislado de la especie *Syngnathus schlegeli* secuenciado en este trabajo fue más cercano a las cepas WB y Jasper. Por otro lado, (Barrera-Mejía et al. 2010) utilizaron el mismo método descrito anteriormente, con 8 pares de partidores que amplificaban fragmentos abarcando la secuencia completa correspondiente a la proteína VP1. Este procedimiento se aplicó a una muestra de virus IPN de origen mexicano aislada de la especie *Oncorhynchus mykiss*. Para comparar se utilizaron 22 secuencias de birnavirus procedentes de GenBank. El árbol

filogenético determinó 3 grupos genéticos diferentes, donde el genogrupo 1 estuvo constituido por las cepas de referencia WB y Jasper, y Sp perteneció a un grupo diferente (señalado como genogrupo 2). El aislado mexicano correspondió al genogrupo 1, por lo que fue más cercano a las cepas norteamericanas.

Por otro lado, los trabajos de Romero-Brey et al. (2009), Dadar et al. (2013), Dadar et al. (2014) y Davies et al. (2010) secuenciaron el genoma del virus completo. Los primeros autores secuenciaron el genoma completo de 7 aislados de birnavirus acuáticos canadienses y realizaron un análisis filogenético comparando tanto el segmento A como el B. La mayoría de los aislados fueron agrupados junto con cepas de referencia norteamericanas, salvo un aislado, que fue cercano a la cepa de referencia Ab. Además, se encontró discrepancia en la clasificación al comparar el segmento A y el B de una de las cepas encontradas, debido a que en el árbol filogenético realizado con el segmento A esta cepa se mostró cercana a las cepas norteamericanas, mientras que en el árbol del segmento B, estaba más cercana a la cepa de referencia europea Ab; es por esto que los autores sugirieron una posible recombinación natural entre dos cepas de *Aquabirnavirus* dentro de un mismo hospedador. El trabajo de Davies et al. (2010) clasificó a dos birnavirus acuáticos de baja patogenicidad aislados en Australia, a partir de salmón del Atlántico. El árbol filogenético construido en base al fragmento de la proteína VP2 agrupó a ambos aislados en el genogrupo 5. Dadar et al. (2013) obtuvieron dos aislados a partir de truchas arcoíris en un brote de virus IPN en Irán. Al comparar los árboles filogenéticos resultantes del segmento A y B, ambos aislados iraníes resultaron ser clasificados en el genogrupo 5, siendo más cercanos a cepas de referencia europeas. Posteriormente, Dadar et al. (2014) colectaron muestras de trucha arcoíris moribundas por causa de brotes de la enfermedad, en 3 provincias distantes. Se secuenció el genoma completo, es decir segmento A y B, para posteriormente compararlos con diferentes aislados previamente reportados de diferente origen. Los resultados indicaron que todos pertenecían al Genogrupo 5 y que presentaban gran cercanía a aislados europeos, particularmente a un aislado español, por lo que los autores sugieren que el virus fue introducido a partir de fuentes europeas.

Por su parte Heppell et al. (1992), Lee et al. (1996) y Cutrin et al. (2004) efectuaron clasificaciones del virus en base a la técnica molecular Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). En el primer trabajo los autores amplificaron un fragmento de 359 pb correspondiente a una región codificante de NS procedentes de 37 aislados de birnavirus acuáticos, y utilizaron como referencia aislados correspondientes a los serotipos WB, Sp, Ab, Te, N1, He, Can1-2-3 y Jasper. Los fragmentos polimórficos se obtuvieron mediante la digestión de 5 enzimas de restricción.

Se distinguieron 3 genogrupos que no se correlacionaron con la serotipificación señalada anteriormente, y la mayoría de los aislados fueron clasificadas en un genogrupo denominado I. Se destaca que los serotipos Sp y N1 pertenecieron al mismo grupo, desechando teorías anteriores que los posicionaban como serotipos diferentes (Christie et al. 1988). Posteriormente, (Lee et al. 1996) amplificaron una porción más grande (1180 pb) abarcando toda la porción codificante de VP2 para un total de 12 muestras de birnavirus de origen asiático, comparándolos con los serotipos de referencia WB, Sp, Ab, Te y N1, realizando la digestión con 9 enzimas de restricción. Como resultado se obtuvo una correlación con la serotipificación, ya que Ab, Te, WB y Sp junto con N1 constituyeron 4 genogrupos diferentes, y la mayoría de los aislados asiáticos fueron agrupados junto con el serotipo Ab.

El trabajo de Cutrín et al. (2004) realizó una comparación más completa utilizando dos técnicas moleculares aplicadas a 10 serotipos de referencia (A1-9 y B1) y 15 aislados provenientes de birnavirus acuáticos. Por un lado, estos autores realizaron una secuenciación mediante la utilización de 16 pares de cebadores que abarcaron por completo los 3 ORF del el genoma viral (VP5, pVP2-NS-VP3 y VP1), y por otro lado realizaron un análisis de RFLP que consistió en la amplificación de un fragmento de 1179 pb, parte del sector codificante de VP2, para luego someterlo a una digestión con 10 enzimas de restricción. Los autores compararon los 3 árboles filogenéticos resultantes de los ORF y se obtuvieron los mismos 6 genogrupos previamente descritos por Blake et al. (2001). El árbol resultante de los fragmentos de restricción fue semejante al de la secuenciación, salvo que se obtuvieron 7 grupos y en este caso los serotipos WB y Jasper se encontraron separados.

Actualmente, en varios países se ha llevado a cabo una clasificación de los virus IPN y birnavirus acuáticos presentes en cada uno, los cuales se resumen en la Figura 6.

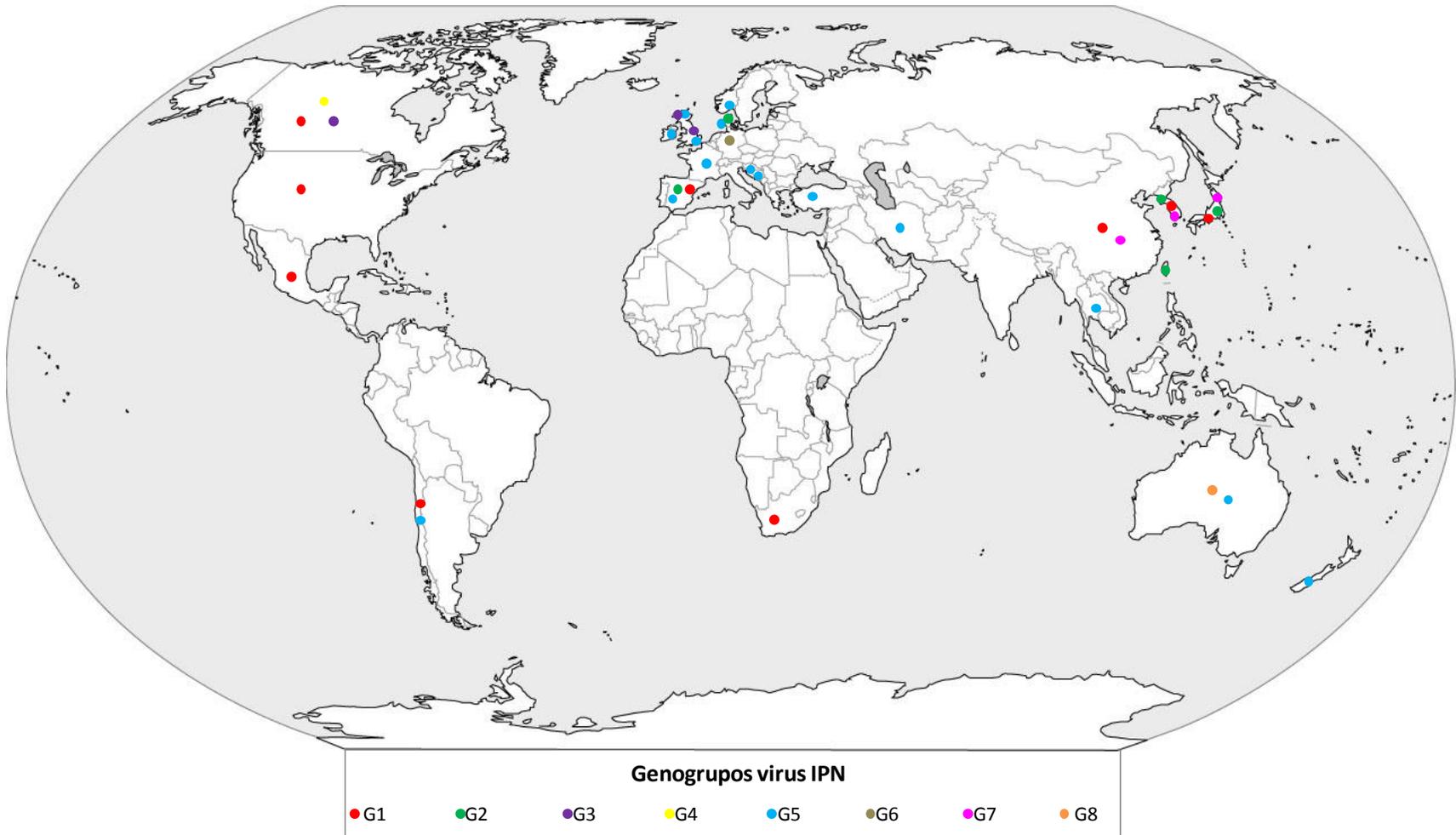


Figura 6. Resumen de los distintos grupos genéticos de birnavirus acuáticos, distribuidos mundialmente. (Elaboración: Laboratorio de Virología, UV).

En Chile, la primera cepa aislada del virus IPN fue en 1984 y correspondió al serotipo VR-299 (McAllister & Reyes 1984; Espinoza et al. 1985), por lo que se creyó que el virus que afectaba a los salmónidos de cultivo en Chile tenía su origen en Norteamérica. Posteriormente, (Fernandez 2005) indicó que el Servicio de Ictiopatología de Fundación Chile efectuó un análisis mediante la utilización de anticuerpos monoclonales a muestras de casos clínicos de la enfermedad IPN provenientes de la Región de los Lagos y confirmó la presencia de otro serotipo aparte de VR-299, el serotipo Sp.

En la actualidad, se siguen encontrando los dos serotipos señalados, los que se han confirmado mediante técnicas moleculares (Eissler et al. 2011, Mutoloki & Evensen 2011, Tapia et al. 2015). Sin embargo, Fernandez (2005) reportó además la presencia del serotipo Ab al analizar una cepa nacional proporcionada por la Universidad Austral de Chile, y que además se encuentra almacenada en el cepario del Laboratorio de Acuagestión - Fundación Chile. Este autor, además, analizó 15 aislados de virus IPN provenientes de la especie *Salmo salar*, mediante el método de RFLP, utilizando un par de partidores para amplificar una región de 1180 pb aproximadamente, que corresponde a un sector hipervariable de la porción codificante de VP2. Se observó el patrón para cada aislado digerido con cada una de las 5 enzimas de restricción (*EcoRI*, *BamHI*, *PvuII*, *MboI* y *XhoI*) y se compararon con los patrones obtenidos para los serotipos de referencia VR-299, Sp y Ab. Los resultados mostraron un 100% de similitud en los patrones de los 15 aislados con la cepa de referencia Sp.

Por otro lado, Mutoloki & Evensen (2011) secuenciaron una porción parcial de la región codificante de la proteína VP2 (502 pb) de 31 aislados de virus IPN, 10 de ellos provenientes de Chile. Al realizar la reconstrucción filogenética las secuencias de los aislados virales se compararon con las secuencias de las cepas de referencia Jasper, Can 1, Can 2, Can 3, WB, N1 y NVI-015. De esta comparación resultaron 4 genogrupos que fueron equivalentes a los grupos propuestos por Blake et al. (2001). Los aislados chilenos, junto con los europeos, mostraron cercanía con la cepa de referencia N1 y formaron únicamente parte del genogrupo 5.

Por su parte Eissler et al. (2011), probaron la detección del virus mediante la técnica de qRT-PCR, y además realizaron una secuenciación y posterior clasificación filogenética de 5 aislados chilenos. Como resultado se obtuvo una detección positiva de virus IPN tanto con el segmento A

como con el B, mientras que el análisis filogenético determinó que 3 de los aislados pertenecían al genogrupo 1 y los restantes dos al genogrupo 5.

En el trabajo realizado por Calleja et al. (2012), los autores utilizaron la técnica de qRT-PCR en combinación con sondas de hidrólisis “Universal Probe Library” (UPL) para detectar y genotipificar aislados chilenos de virus IPN. La amplificación, secuenciación y posterior reconstrucción filogenética de un segmento codificante de la proteína VP2 (1175 pb) para 7 aislados chilenos confirmó que estos se agrupaban en los genogrupos 1 y 5 (la mayoría pertenecientes al 5). Posterior a esto, se efectuó un análisis a 32 aislados chilenos de virus IPN mediante la técnica RT-PCR en tiempo real utilizando dos pares de sondas UPL con sus partidores específicos, resultando en una detección y tipificación satisfactoria del genogrupo 1 (WB) y el genogrupo 5 (Sp). Avendaño et al. (2015) utilizaron también esta técnica con sondas UPL (sondas #8 y #117) para la amplificación de aislados virales de los genogrupos 5 y 1 respectivamente. Los resultados obtenidos de estas pruebas fueron comparados con los cultivos celulares infectados con las muestras, en donde ambas técnicas detectaron en un 100% todos los casos positivos. Lo interesante de estos resultados, es que las muestras positivas para el genogrupo 5 fueron detectadas, solamente, en peces de la especie salmón Atlántico provenientes de agua dulce. En cambio, los virus del genogrupo 1, fueron detectados en muestras de peces (*S. salar* y *O. mykiss*) provenientes tanto de agua dulce como salada.

Estos últimos años han continuado los aportes en clasificación de virus IPN en Chile, ampliando la extensión geográfica de la toma de muestras. Los trabajos de Tapia et al. (2015) y Torres et al. (2016) emplean la secuenciación parcial para identificar los grupos genéticos presentes en Chile. El primero utiliza la secuenciación de dos segmentos de VP2, 1180 y 523 pb, valiéndose de esta última amplificación para identificar genogrupo en los casos en que no se pudo secuenciar el fragmento más largo. De las 46 muestras de campo, provenientes de pisciculturas y centros de cultivo durante los años 2012 y 2013, se lograron secuenciar 29; la mayoría correspondieron al genogrupo 5, es decir, similares a las europeas, y solo 5 pertenecieron al genogrupo 1 (ver Figura 7). Por otro lado, Torres et al. (2016) realizaron la amplificación por medio del PCR anidado directamente desde el homogeneizado de la muestra. Recibieron muestras de 19 localidades diferentes, entre noviembre del 2009 y agosto del 2015. Se identificó la presencia del Genogrupo 1 y 5, como antes ya ha sido señalado para Chile. Un hallazgo importante reportado en este trabajo, es

la relación hospedador-específica de los genogrupos con sus hospedadores: los virus del Genogrupo 5 provinieron de *Salmo salar* y los del Genogrupo 1 del género *Oncorhynchus*. Además, se observó la separación de virus chilenos en un subgrupo aparte de los aislados de referencia en el Genogrupo 1, tendencia que ya se había observado en Tapia et al. (2015), por lo que los autores proponen que sea considerado como el genotipo chileno.

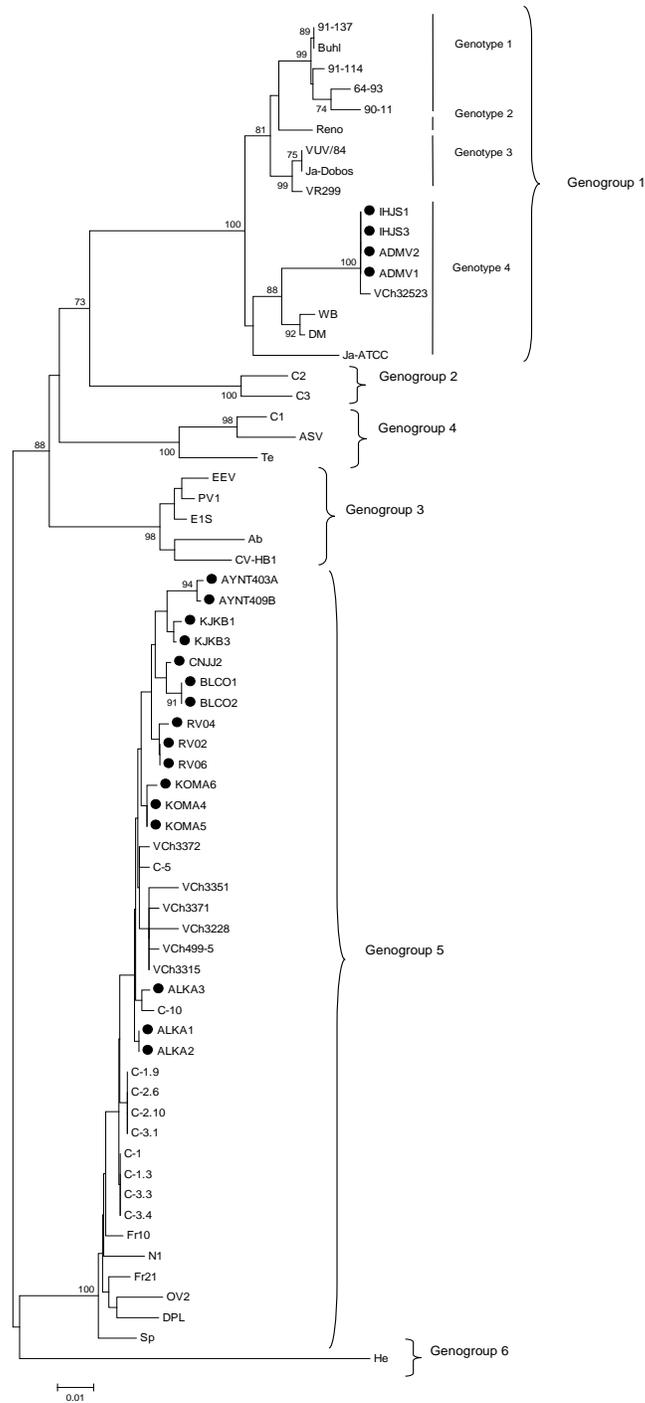


Figura 7. Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias de aminoácidos, del segmento de 1180 pb del gen VP2, entre las muestras secuenciadas en este trabajo (círculos negros) y las secuencias de referencia de (Mutoloki & Evensen 2011); (Calleja et al. 2012) y (Blake et al. 2001). Para el análisis filogenético se utilizó el método Neighbor-joining, y la robustez del árbol se evaluó a través de 1000 iteraciones de bootstrap. (Fuente: (Tapia et al. 2015))

## *Virulencia*

Conocer la capacidad del virus IPN de ocasionar la enfermedad, su frecuencia y gravedad, se dificulta en los casos en que no se tienen registros del origen del aislado y la mortalidad observada una vez ocurrido el o los brotes de la enfermedad. Por lo que se han propuesto métodos para determinar la virulencia o un indicador de ésta mediante observación del genoma viral. Sano et al. (1992) determinaron que el segmento A del genoma del virus es el responsable de la virulencia. Los autores Bruslind and Reno (2000) realizaron una infección experimental en 400 alevines de trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) con 3 cepas del genotipo Buhl (genogrupo 1). La exposición al virus duró 62 días y arrojó una mortalidad acumulada de 67%, 78% y 93%, con una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de mortalidad ocasionada por la cepa que presentó un 93% de mortalidad en contraste con las dos restantes, considerándola una cepa virulenta. Se secuenciaron los genes de las proteínas VP2 y VP3 para determinar los posibles determinantes de virulencia. Los autores sugirieron que la causa más probable de la variación en la virulencia de estas 3 cepas es la posición 217 en el gen de la proteína VP2, debido a que la cepa virulenta presentó Treonina en la posición 217, mientras que las cepas menos virulentas (moderadamente virulentas) tenían el residuo Alanina en esa posición. En el trabajo de Santi et al. (2004) se estudió la mortalidad ocasionada por 9 cepas noruegas correspondientes al serotipo Sp, a partir de una infección experimental realizada en alevines de la especie *Salmo salar*. Se amplificó y secuenció por completo el segmento A tanto de los aislados originales como de estos mismos recuperados luego de realizada la infección. Se determinó que los aislados virulentos presentaban residuos de Treonina en la posición 217 y de Alanina en la posición 221, y los aislados avirulentos mostraban el residuo Prolina en la posición 217. Además, los autores sugirieron que los aislados virulentos poseían una proteína VP5 truncada de aproximadamente 12 kDa, al encontrar esta característica en 4 de 5 aislados que ocasionaron una alta mortalidad. Posteriormente, en el trabajo de Santi et al. (2005), mediante la creación de tres recombinantes genéticos del serotipo Sp: uno que codificaba para la proteína VP5 de 15 kDa, otro que no posee el codón de inicio para sintetizar la proteína VP5 y el otro que codifica para la proteína VP5 truncada de 12 kDa, descartaron cualquier correlación de la proteína VP5 con la virulencia del virus debido a que las 3 cepas recombinantes ocasionaron mortalidades en post-smolt sobre el 80%. Song et al. (2005) estudiaron la importancia de los aminoácidos en las posiciones 217 y 221 mediante la utilización de varias cepas de virus recombinantes del serotipo Sp, y además realizaron 9 pases seriados en células CHSE-214 para descubrir la importancia de la posición 221 en la

virulencia y atenuación del virus. Estas cepas recombinantes fueron inoculadas en alevines de *Salmo salar* silvestre y, posterior al desarrollo de la infección durante 32 días, fueron recuperadas nuevamente para su aislamiento y secuenciación. Se determinó que la combinación de ciertas posiciones de residuos de aminoácidos determinaban la virulencia: las cepas que presentaron Treonina en posición 217 y Alanina en posición 221 fueron virulentas, ocasionando un 70% de mortalidad, las cepas con sustitución Prolina 217 y Alanina 221 mostraron una virulencia moderada (47% de mortalidad) y las cepas que presentaron Treonina 221 fueron avirulentas independiente del residuo en posición 217. Adicionalmente se descartó que la posición 247 estuviera directamente correlacionada con la virulencia. No obstante, en los trabajos de Dadar et al. (2013) y Dadar et al. (2014) se ha clasificado la mortalidad de los aislados secuenciados como de moderada virulencia, a pesar de mostrar Treonina 221, asociada a aislados avirulentos. Estos autores sugieren la relación de esta virulencia moderada al residuo Alanina en la posición 247.

Mutoloki et al. 2016, investigaron la asociación entre la manifestación clínica de la enfermedad y el gen que codifica la proteína VP2 del virus. Para ello, se cultivaron peces de la especie salmón atlántico, por un período de tres años, tanto en agua dulce como en agua de mar, los cuales fueron situados en lugares cuyo historial, en relación a la enfermedad, era de muy alto o muy bajo riesgo. Los virus aislados de peces con manifestaciones subclínicas presentaron el siguiente motivo de virulencia, P217T221A247, en cambio aquellos virus que fueron aislados de peces con claros signos de la enfermedad presentaron un motivo altamente virulento, T217A221T247. Los análisis filogenéticos presentaron dos clados: uno asociado a los aislados subclínicos y otro relacionado con los aislados que presentaron signos evidentes de la enfermedad. Además, este estudio se refiere a dos hallazgos importantes: por un lado, un grupo de peces infectados por IPN en agua dulce transporta su infección al ser trasladados a agua de mar, y por otro lado, los sitios de agua dulce y marino pueden convertirse en reservorios de virus IPN, por lo que sería fuentes de infección.

La sustitución en la posición 221, además de estar relacionada con la virulencia de una cepa, también está involucrada en la persistencia de la infección (Song et al. 2005), ya que se ha observado una rápida sustitución del aminoácido Alanina, que es el que se correlaciona con la virulencia, por el aminoácido Treonina. Esta sustitución se detectó luego de 2 pases del virus en cultivo en células CHSE-214, e incluso se mantuvo luego de realizados 10 pases (Santi et al. 2005).

Los autores explican esta situación asociando al residuo 221 la función de reconocer al receptor que media la entrada del virus a las células CHSE-214, pero no así para la línea celular RTG. Esta misma sustitución, incluso, se ha observado en peces portadores (Song et al. 2005). Santi et al. (2004) manifestaron que parte del virus se anticipa a cambiar una rápida replicación y transmisión, por un mecanismo que le permita sobrevivir largo tiempo en el hospedador, por ejemplo, en situaciones en que hay pocos hospedadores disponibles para infectar. Aun así, en este trabajo los virus del genogrupo 5 mostraron en la posición 217 el aminoácido Treonina que se relaciona con virulencia, pero en el residuo 221 se observó casi la misma proporción de Alanina y Treonina en posición 221, además que dos aislados mostraban Serina como residuo en esa posición, a pesar de que la mayoría de los aislados se recuperaron luego de 2 o 3 pases. En el trabajo de Santi et al. (2004) obtuvieron diferentes sustituciones en la posición 221 después de 2 pases para 9 aislados del serotipo Sp, por lo que proponen que es el resultado de una constante presencia de clones que están siendo seleccionados para adaptarse al cultivo.

A pesar de que mayoritariamente se ha determinado que el segmento A del genoma del virus es el responsable de la virulencia, se han encontrado cepas virulentas en la especie *Salmo salar* con residuos de Prolina en la posición 217 y Alanina en el residuo 221 (Smail et al. 2006), por lo que es muy probable que existan otros determinantes para reconocer cepas virulentas, posiblemente en el segmento B del virus. Liu and Vakharia (2004) demostraron que en el virus IBDV, perteneciente a la familia birnaviridae, la proteína VP1 está involucrada en la eficiencia de la replicación viral, además que modula su virulencia *in vivo*. Asimismo, Shivappa et al. (2004) sugiere la posibilidad de que la proteína VP1 pueda tener un rol en la virulencia del virus IPN. Los resultados de la infección experimental en alevines y post-smolt de *Salmo salar* realizada en su trabajo mostraron que el aislado que presentó mayor virulencia, 79% de mortalidad acumulada en post-smolts, tenía las sustituciones Treonina217 y Treonina221; en cambio, el aislado que ocasionó una mortalidad moderada, 46% en post-smolts, mostró las sustituciones Prolina217 y Alanina221, al igual que el aislado avirulento. Por esta razón los autores sugirieron que no era posible explicar la virulencia del virus sólo basándose en VP2, y consideraron que VP1 podía aportar información al respecto, ya que encontraron que los dos aislados virulentos diferían en las mismas posiciones 125, 154 y 240 en VP1 en contraste con la cepa avirulenta.

Fernández (2005) afirma que la cepa Sp es una de las más patógenas que afecta a los cultivos de salmón del Atlántico en Chile, alcanzando mortalidades del 60% tanto en agua dulce como salada. En Europa esta misma cepa ha sido la más virulenta para truchas (Reno 1999), por lo que generalmente los aislados asociados a este serotipo son considerados virulentos. No obstante, Calderón (1998) encontró que la cepa VR-299 fue notoriamente virulenta para alevines de salmón Coho y salmón del Atlántico, ocasionando hasta un 40% de mortalidad, pero además observó que los signos clínicos presentados no fueron muy específicos ni evidentes. A pesar de esto, no se puede generalizar sobre la virulencia de un serotipo y atribuir esta característica a todos los aislados similares a este ya que se ha evidenciado variación en la virulencia entre aislados de un mismo serotipo, tanto para serotipos europeos (Santi et al. 2004) como para norteamericanos (Bruslind & Reno 2000). Por otro lado, la virulencia también está relacionada con otros factores aparte de la genética del virus que se deben tomar en cuenta al momento de aseverar que una cepa específica es virulenta, como son la susceptibilidad genética del hospedador, la edad y el nivel de estrés en el entorno (Guerrero et al. 2008).

El virus IPN presenta una reconocida región hipervariable en su genoma, que se asocia a la patogenicidad viral, pero poco se sabe de los mecanismos moleculares asociados a la enfermedad y menos aún, de la respuesta inmune del hospedero influenciada por el virus. Skjesol et al. 2011, discute acerca del delicado balance existente entre la respuesta inmune del huésped y las características genéticas de la cepa viral, que se encuentran presentes en un brote con variaciones de mortalidad. Tras la infección, el huésped expresa genes de su sistema inmune relacionados, directamente, con la tasa de replicación del virus. El trabajo fue realizado con dos aislados virales de campo, NFH-Ar y NFH-EI, resultando el primero de ellos 4 veces más virulento. Dentro de sus conclusiones resaltan que, la proliferación del virus parece ser muy susceptible, evidenciado por los cambios en el genoma viral, a la respuesta inmune del pez.

Julin et al. 2013, realizaron un estudio en donde el objetivo fue centrado en si las variantes de virus IPN, con diferentes grados de virulencia, aisladas a partir de muestras de campo, podrían explicar la variabilidad en la protección de los peces post-smolt vacunados. Analizaron, para ello, las bases moleculares de la virulencia de los aislados obtenidos, a partir de muestras de campo y, la virulencia expresada en términos de mortalidad, de los peces desafiados con ocho aislados virales. Los investigadores encontraron que hubo muy poca variación en la secuencia de la región variable

que codifica VP2. Además, la mortalidad acumulada después de los desafíos realizados con virus caracterizados como virulentos fue siempre alta (40-56%), mientras que la mortalidad acumulada de la misma cepa en peces vacunados fue de un 1 a un 50%. La protección contra la enfermedad varió a pesar de usar la misma vacuna. Esto demuestra que las diferencias en virulencia de los aislados, no fue la principal razón para explicar la mortalidad, proponiendo la superoxigenación y la calidad de agua como factores de riesgo para que peces, del tamaño de los alevines o smolts, sean más susceptibles a la enfermedad.

Es muy importante tener en cuenta que dentro del género Birnaviridae se ha demostrado que, el reordenamiento de genes es una estrategia evolutiva que contribuye a la diversidad genética. Favoreciendo de este modo la aparición de enfermedades emergentes como, asimismo, las variaciones de cierta en cepas en su virulencia. Lago et al. (2016) demuestran que este mecanismo es dependiente de la célula hospedadora y que no ocurre aleatoriamente. Es más, se piensa que ocurre tras la expresión de específicas clases de mRNA, en los ribosomas de algunas células y por la asociación específica de los componentes para la construcción de complejo de ribonucleoproteínas y/o ribonucleoproteínas de inhibición cruzada.

### **Técnicas de diagnóstico**

En el área de diagnóstico, nuestro país cuenta con medidas sanitarias efectivas en la certificación de la presencia del virus, sin embargo posee la gran limitación de que solo se estudian aquellos peces que presentan manifestaciones clínicas de la patología, excluyendo de los estudios a aquellos peces que presentan el virus inactivo y a aquellos que presentan concentraciones bajas del virus, que permanecen como portadores asintomáticos. No obstante, los tres grupos mencionados anteriormente, son capaces de transmitir la enfermedad y generar su diseminación, por lo cual el estudio y detección del virus debe centrarse en todos los grupos con el objetivo de contar con métodos sensibles, específicos permitiendo un mayor control sanitario.

Para el aislamiento del virus se realizan cultivos celulares de células susceptibles, dentro de las recomendadas por la OIE se cuenta con: CHSE-214 (Chinook Embryo Cells), EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*), RTG-2 (Rainbow Trout Gonad), BF-2 (Bluegill fry) y SAF-1 (*Sea Bream Fins*), sin embargo se ha demostrado que para virus IPN, las líneas celulares que producen los mejores resultados para su aislamiento y cultivo *in vitro* son las CHSE-214 y BF-2 (Reno 1999;

Lorenzen et al. 1999). Los cultivos han de mantenerse a un pH 7.6 y suplementado con 2% de suero fetal bovino (SBF) y se incubó a 15°C, (OIE 2006).

La totalidad del proceso de replicación viral transcurre en el citoplasma de células susceptibles y tarda entre 16-22 horas, tras lo cual se observa un dramático efecto citopático (CPE) en las células infectadas (Rodríguez et al. 2003), cada una de las cuales producirá entre 1000 y 2000 partículas virales infectivas ( $10^6$  a  $10^9$  UFP/mL sobrenadante) (Dobos 1977). En un ciclo replicativo del virus, moléculas de RNA de cadena simple (mRNA viral) son detectadas en las células 2-4 horas post-infección, mientras que la progenie de RNA viral de doble cadena aparece 2 horas más tarde. La síntesis de RNA específico del virus alcanza su máximo 8-10 horas post-infección y finaliza 5 horas después (Rodríguez et al. 2003). Tras realizar un ensayo de TUNEL, diseñado para detectar DNA fragmentado durante la apoptosis, a células infectadas con virus IPN, se encontraron marcas citosólicas que corresponden a intermediarios replicativos del RNA viral (Espinoza y Kuznar, 2010). La máxima intensidad en el marcaje se obtuvo entre las 8 y 10 hpi y fue negativa ya a las 14 hpi, Figura 9. Estos resultados son coherentes con los publicados por Rodríguez et al. (2003). La localización temporal y sub-celular de las principales proteínas estructurales del virus IPN en el progreso de la infección en células CHSE-214 fue descrita por Espinoza et al. (2000).

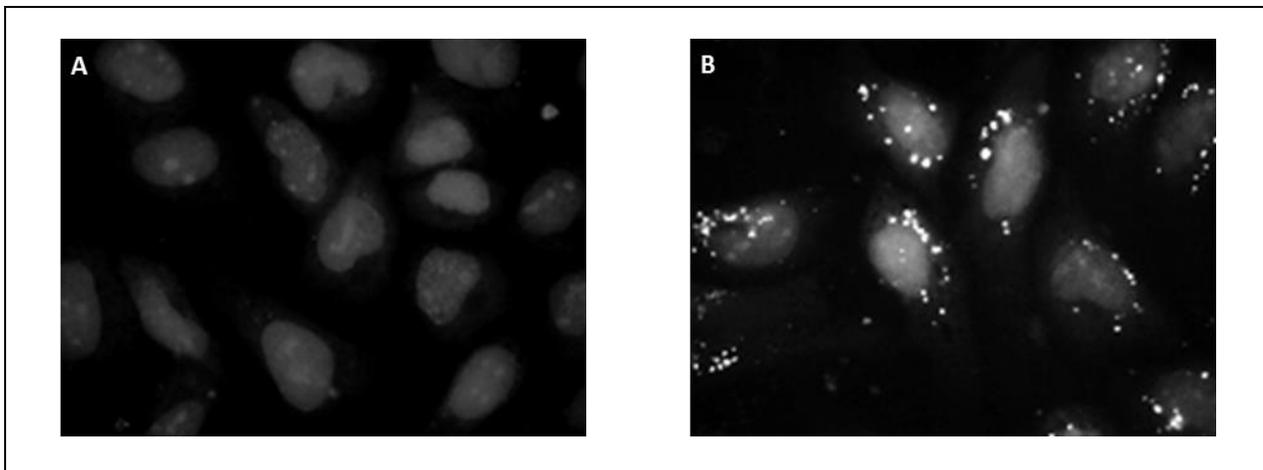


Figura 8. A. Microfotografía de células CHSE-214 utilizadas como control no infectado y en B infectadas con virus IPN. Tras 6 horas pi, las células fueron tratadas para realizar el método de TUNEL. Aumento de 400X. Espinoza & Kuznar (2010).

El virus amplificado en cultivos celulares puede ser concentrado con polietilenglicol y purificado a través de centrifugación en gradiente de CsCl y sacarosa (Chang et al. 1978). Como

resultado de la centrifugación en gradiente se obtienen dos bandas diferenciadas, una dominante constituida por partículas virales completas cuya densidad es de  $1.33 \text{ g cm}^{-3}$  (Kelly & Loh 1972), y una banda menor (densidad de sedimentación  $1.29 \text{ g cm}^{-3}$ ) compuesta por un grupo de partículas heterogéneas en tamaño correspondientes a polipéptidos virales o partículas iniciales en el proceso de armado del virus, que presentan daño en la cápside o pérdida de material genético (Dobos et al. 1977). La producción de este componente de menor densidad en el proceso de amplificación viral parece ser favorecida cuando se aplican altas multiplicidades de infección (m.d.i.) sobre los cultivos celulares. Estas partículas defectivas pueden interferir en los siguientes procesos de replicación del virus, reduciendo el número de partículas virales con capacidad infectiva que se producirán (Dobos 1995) o bien generando infecciones persistentes (Kennedy & MacDonald 1982).

### ***Cuantificación del Virus***

Dentro de los sistemas de detección utilizados en esta industria encontramos principalmente tres métodos eficaces en la detección definitiva del virus, sin embargo estos poseen claras ventajas y desventajas, por lo cual al momento de decidir se debe tener en consideración ellos, con el objetivo de utilizar el método más efectivo.

#### **A) Método del plaqueo:**

Es el método considerado como estándar en la detección viral, debido a que permite realizar la cuantificación de los virus activos, es decir, que poseen capacidad infectiva. Éste consiste en infectar una monocapa de células con el virus proveniente de un aislado y tras realizar su adsorción, se agrega medio nutritivo semisólido, en este caso agar, lo cual permite que la progenie del virus solo pueda migrar e infectar aquellas células contiguas, limitando su movilidad. Posteriormente se observa el efecto de la acción viral al visualizar células lisadas en forma de circunferencia debido a la distribución de la progenie viral, las cuales son llamadas placas de lisis, la mejor visualización de este efecto es a través de la tinción con cristal violeta, en la cual, las células no infectadas son capaces de adquirir el colorante, contrastando a las células afectadas por la lisis celular, pues no lo adquieren, sin embargo es una técnica que requiere de 72 horas para ser observada la acción de la progenie viral mediante estas placas de lisis, como se observa en la Figura 9.

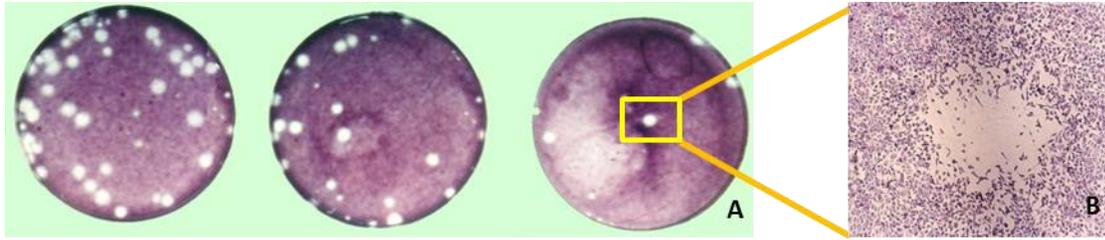


Figura 9. Tras diluir la muestra e infectar la monocapa de células es posible apreciar las placas de lisis, tras varias horas post infección (A). Ésta corresponde al efecto producido por la actividad biológica, de una sola partícula viral, cuyo virus progenie fue infectando solamente a las células vecinas, generando un efecto lítico concéntrico, llamada Placa de Lisis (B).

#### B) ELISA e Inmunoblotting:

ELISA e inmunoblotting son sistemas que se basan en la detección de antígenos o anticuerpos. Son reacciones inmunoenzimáticas que, en el caso del ensayo ELISA la reacción final es un producto soluble y, en cambio, en el inmunoblotting, el producto es precipitable. En la Figura 11, se muestra un ensayo realizado para comparar estas dos técnicas. Las muestras provenían de un aislado viral obtenido de alevines de truchas infectadas con virus IPN. El virus fue incubado a la placa de ELISA y, de la misma muestra, se tomó una alícuota para aplicarla a la membrana de nitrocelulosa. El virus fue detectado con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína VP2 y este anticuerpo, producido en ratón, detectado a su vez por anticuerpos conjugados a una enzima que, al agregar el sustrato específico, produjo un cambio de color en el test de ELISA y en el caso del inmunoblott una reacción coloreada que precipitó, tiñendo la membrana de nitrocelulosa (Cifuentes et al. 1990). En el caso de pesquisar antígenos, la sensibilidad es baja y solamente podría detectarse cuando la viremia, en el pez, es alta. En este caso puntual, toda la piscicultura estaría con una alta mortandad y no se contaría con una buena capacidad de gestión, como para decidir un aislamiento, por ejemplo. Algunos investigadores, han desarrollado técnicas ELISA para la detección de anticuerpos, para este tipo de ensayos se recomienda trabajar a temperaturas en la que estos anticuerpos funcionan, es decir, a la temperatura del pez, aproximadamente 15°C.

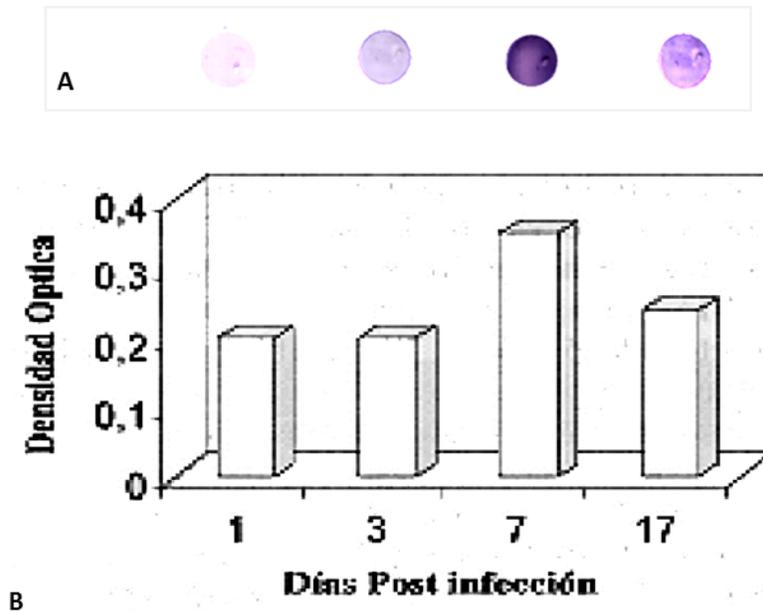


Figura 10: Ensayos de Inmunodot y ELISA. Detección directa del virus IPN mediante ELISA e inmunodot en extractos de alevines infectados. Las manchas de inmunodot (A), se disponen en el extremo superior del gráfico y en forma correlativa con los resultados del ensayo de ELISA (B), Cifuentes et al. (1990).

Dixon & Hill (1983) publicaron un trabajo para la rápida detección del virus a través de un ensayo de inmuno-adsorción enzimática (ELISA). Esta técnica consiste en la detección del antígeno viral, el cual es capturado por anticuerpos, pre incubados en los micropocillos de una placa de poliestireno. Los anticuerpos son pegados en la fase sólida tras un período de incubación de 6 horas. Muestras que contenían virus fueron agregadas a la microplaca y éstos fueron capturados por los anticuerpos ya pegados en la fase sólida, tras un lavado se agregó un segundo anticuerpo dirigido contra el virus, el cual estaba conjugado a una enzima. Tras agregar el sustrato específico, una coloración en el pocillo, demostraba la detección del virus. El virus pudo ser detectado desde alevines infectados inmediatamente después del brote, pero la sensibilidad de la técnica no fue mayor al del aislamiento del virus en cultivo celular, especialmente fue observado en peces en estado portador.

### C) Inmunofluorescencia:

La técnica de Inmunofluorescencia permite la identificación de antígenos virales a través de la utilización de un anticuerpo dirigido contra alguna proteína viral, éstos, usualmente, son del tipo

monoclonal y producidos en ratón. La técnica consiste en detectar estos anticuerpos que, previamente, han reconocido una proteína viral, utilizando un segundo anticuerpo, dirigido contra la IgG de la especie seleccionada para la producción del anticuerpo primario que, en el caso de ser monoclonal es, entonces, anti ratón. Este segundo anticuerpo se encuentra conjugado, con una molécula capaz de emitir una luz fluorescente, cuando es excitada por una luz en un rango de longitud de onda muy específico, utilizando, para este objetivo, un microscopio de fluorescencia. En la fotografía de la Figura 11 se observa una inmunofluorescencia en la cual se utilizó anticuerpo anti VP2, para identificar las células infectadas con el virus IPN

Células susceptibles de ser infectadas por el virus IPN, son sembradas sobre un cubreobjetos redondo depositado en una placa de cultivo de 24 pocillos. Tras un ciclo de replicación del virus, las células son fijadas y permeabilizadas para realizar este ensayo de inmunofluorescencia. Tu et al. (1974) desarrollaron un ensayo indirecto de inmunofluorescencia (IFAT) para el diagnóstico de la infección por virus IPN in vitro, definiendo las condiciones óptimas para su utilización en cultivos celulares. El método aprovecha la ventaja de que las proteínas del virus IPN pueden ser tempranamente visualizadas en células infectadas, y utiliza la técnica de inmunofluorescencia para detectarlas dentro del primer ciclo replicativo (12-14 horas post-infección). Cada célula con señal fluorescente observada es equivalente a un foco infeccioso generado por una sola partícula viral infectiva. El rango de variabilidad de los resultados obtenidos es de 16 a 23% cuando se visualizan entre 100 y 200 células fluorescentes en el cultivo celular, y la sensibilidad del método es tres veces mayor que la del método de Unidades Formadoras de Placas (UFP) para la cuantificación de virus IPN biológicamente activo. Sin embargo, por ser éste un método en el que se obtienen títulos virales a partir del análisis de diluciones seriales, la susceptibilidad a error de los resultados es alta e inevitable, debido al error aditivo inherente a las fases de pipeteo seriales (Condit, 2007).

Más adelante, Espinoza & Kuznar (2002) modificaron el método de Tu et al. (1974), detectando las proteínas virales en la fase final del primer ciclo infectivo (16 horas p.i.). Estos autores lo denominaron Método de Recuento de los Focos Fluorescentes, en alusión a las células infectadas exitosamente, que son evidenciadas como “focos” de fluorescencia. Destacaron también las ventajas comparativas de este método en relación al método de Unidades Formadoras de Placas (UFP) en cuanto a que grandes concentraciones de virus pueden ser contabilizadas en pequeñas áreas y a que los resultados pueden ser obtenidos en un corto período de tiempo. Un foco

fluorescente, por definición, es una célula infectada positivamente por una sola partícula viral, y se reconoce por presentar una marca perinuclear fluorescente característica. El número de FF totales contabilizados en una monocapa celular se relaciona con el número de partículas virales activas (o con capacidad infectiva) presentes en la suspensión viral con la cual fue inoculada (1 FF = 1 célula infectada = 1 partícula viral activa contenida en el inóculo).

Por lo tanto, el título viral (FF/mL) de la suspensión desconocida se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral (FF/ mL)} = (\text{NFF} \times f) \times 10^{(\text{factor de dilución})}$$

Donde:

**NFF**: número focos fluorescentes totales en la monocapa

**f**: factor de conversión del volumen (= 2, si el volumen inoculado es 500  $\mu\text{L}$ )

**d**: factor de dilución

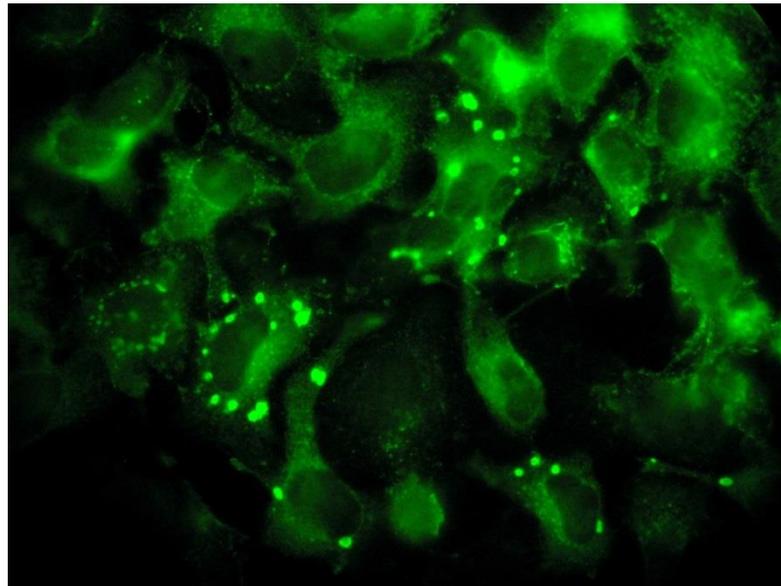


Figura 11: Inmunofluorescencia de células CHSE-214 infectadas con virus IPN. Tras la aplicación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra VP2, se utiliza un segundo anticuerpo, anti ratón conjugado con FITC, el cual emite una fluorescencia verde, cuando es excitado con una luz de longitud de onda de 480 nm, aumento de 400X. (Fotografía gentileza de Juan Carlos Espinoza).

Esta técnica cumple los requisitos para ser considerada el método de screening, para la detección del virus IPN en la industria salmonera, debido a que es una técnica muy sensible, que requiere escasa concentración viral para lograr su detección, lo cual posibilita el estudio de aquellos peces considerados como portadores sanos, además de ser un método que permite la cuantificación del virus proveniente de la muestra, lo que permite lograr la detección del virus durante su primer ciclo replicativo, es decir, antes de las 20 horas post infección.

#### D) Inmunohistoquímica:

El procedimiento de la técnica de inmunohistoquímica descrito en el Manual de la OIE, está basado en el trabajo de los autores Evensen & Rimstad (1990). En donde se pudo detectar la variante Sp del virus, en muestras de tejido pancreático embebido en formaldehído. La ventaja del método radica en que es posible inmunodetectar la expresión de las proteínas virales en las células del tejido infectado y, al mismo tiempo, verificar las características de las lesiones, producidas en los órganos a los cuales el virus afecta.

En un ensayo de infección realizado por Ellis et al. (2010), en donde peces salmón atlántico, post smolt, sin la enfermedad fueron infectados por cohabitación con peces del mismo estadio, a los cuales se les inyectó intra-peritonealmente virus IPN, con el objetivo de emular las condiciones naturales en las cuales los peces adquieren la enfermedad. Tras 16 días post desafío, se obtuvo el primer caso positivo detectado a través de la técnica de inmunohistoquímica. Del total de los 90 peces cohabitantes, solo 11 resultaron ser positivos. El hígado y el páncreas resultaron ser los órganos que mostraron estar más comprometidos tras la infección, dentro de los hallazgos se encontró focos necróticos y células en estado apoptótico especialmente en lo hepatocitos.

#### E) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

La Reacción en Cadena de la Polimerasa de transcripción reversa, también llamada RT PCR, es una técnica de biología molecular, que permite una rápida detección y amplificación del RNA viral, a partir de una mínima cantidad de éste, obteniendo, en un par de horas, millones de copias. La técnica presenta un nivel de sensibilidad cercano a  $1 \times 10^4$  partículas/litro (Chamorro et al. 2006), por lo que es una técnica considerada de importante utilidad en la detección del virus IPN, siendo el método más empleado y recomendado.

En los últimos años el uso de la reacción en cadena de la polimerasa, ha sido cada vez más frecuente, debido a que no es necesario realizar el cultivo viral previamente, por lo que los tiempos de detección se acortan significativamente. En el caso del virus IPN, por ser un virus RNA, es necesario realizar una retrotranscripción, es decir a partir de este RNA viral sintetizar un cDNA, tras lo cual se procede a la amplificación. Un valor importante de este tipo de ensayo es el 'Ct', el cual indica el ciclo en que la señal comienza a ser mayor al ruido de fondo y guarda relación con la cantidad de virus presente en la muestra. De ésta forma, bajos valores de Ct indican una buena cantidad de virus detectable.

El PCR comenzó a ser utilizado para detección de virus IPN por Rimstad et al. 1990, donde utiliza un RT-PCR anidado y destaca que la ventaja de utilizar esta técnica guarda relación con su sensibilidad, ya que fue posible detectar al virus a partir de 0,8 pg de dsRNA viral como templado inicial. El PCR consta de ciclos en los cuales se va variando la temperatura para amplificar segmentos del material genético. Para esto son utilizados partidores (o primers) que son secuencias cortas de DNA con un grupo -OH libre en el extremo 3', el cual le indica a la polimerasa el sector del material genético a ser replicado. Los partidores son diseñados para amplificar una secuencia específica y pueden analizarse bioinformáticamente para comprobar qué tan buena es la unión a ciertas secuencias según su complementariedad y calcular la temperatura media de unión (Tm) para cada caso. La reacción de PCR comienza elevando la temperatura para que las hebras de DNA se separen, luego la temperatura es disminuida hasta una temperatura específica en que se unen los partidores. La temperatura vuelve a ser elevada levemente y con esto comienza la reacción de polimerización. Este ciclo es repetido numerosas veces, a fin de obtener múltiples copias del segmento deseado. En el caso del diagnóstico del virus IPN se utilizan partidores que permiten la amplificación de un sector del genoma del virus (Ørpetveit et al. 2010, Rodríguez Saint-Jean et al. 2001).

En Chile, qRT-PCR y/o IFAT son las técnicas más usadas por los Laboratorios de la Red, para la detección del virus IPN. Además, este diagnóstico debe estar relacionado con la capacidad de detectar diferentes cepas del virus, como lo son los genogrupos 1 y 5, (Tapia et al. 2015). En el trabajo de Tapia et al. (2015) se comparan, además, las principales técnicas de detección del virus, como lo son el qRT-PCR, la inmunofluorescencia y el cultivo celular. Tres técnicas de qRT-PCR son aplicadas, para ello, se utilizan diferentes partidores dirigidos contra las proteínas VP1 y VP2.

De 46 muestras procesadas, procedentes de muestras de campo, resultaron positivas para al menos dos de las técnicas de qRT-PCR, 29 fueron positivas para el cultivo celular y 23 positivas en el caso de la inmunofluorescencia, demostrando, esta última técnica, una menor sensibilidad.

En cuanto a la sensibilidad de esta técnica, Vázquez et al. (2016) diseñaron un RT-qPCR para la detección y cuantificación del virus, utilizando como blanco el segmento B. Éste ensayo fue validado utilizando siete muestras virales de referencia, que incluían dos genotipos virales, europeos (Sp) y americanos (WB y Jasper, Ja) y, 23 aislados obtenidos de muestras de campo. Los límites de detección para la técnica fueron: 66 copias de RNA/mL, 31 TCID<sub>50</sub>/mL o, 50 UFP/mL.

## **Epidemiología y control**

### ***Transmisión***

La enfermedad se transmite principalmente de manera horizontal, a partir de reservorios, vivos e inanimados, y en el caso de los peces en el cultivo existe una mayor probabilidad de que las partículas virales se encuentren en el medio debido a que ocurre una constante emisión de fecas y orina al agua por parte de salmónidos clínicamente enfermos y portadores (Reno 1999, Evensen et al. 2003). Existe evidencia de transmisión vertical, y aunque no ha sido demostrado para salmón del Atlántico (Evensen et al. 2003, Smail & Munro 2008), si se ha probado para trucha arcoíris (Evensen et al. 2003, Skjesol 2009) y trucha de arroyo (Bullock et al. 1976, Bootland et al. 1991).

### ***Reservorios***

Además de los peces portadores dentro del cultivo, también existen otras especies de organismos en las que el virus IPN se puede introducir y almacenar, sin causar la enfermedad. Estos organismos son llamados reservorios, y pueden incluir peces silvestres, especies que cohabitan con los peces cultivados, ectoparásitos, moluscos, plancton, crustáceos, aves y mamíferos. Incluso los sedimentos bajo las balsas jaulas pueden actuar como reservorio para el virus (Evensen et al. 2003).

Debido al hecho de que el virus IPN resiste un amplio espectro de salinidad y temperatura, incluso pudiendo soportar varias semanas a 40°C y mantenerse viable en agua dulce y salada 4

meses, se explica su capacidad para sobrevivir almacenado tanto en reservorios vivos como inanimados (Mortensen et al. 1998). Dixon et al. (2012) probaron que el virus IPN soporta temperaturas de hasta 60°C. Whipple & Rohovec (1994) reportaron que el virus IPN sobrevivió por más de 14 días a condiciones de ensilaje y Smail et al. (1993) también demostraron que el virus puede sobrevivir en ensilaje de peces por más de 15 días a 20°C y a lo menos a por 147 días a 4°C. Por otro lado, el virus IPN sería más sensible a condiciones alcalinas o ácidas y se ha probado su inactivación a un pH de 12 (Dixon et al. 2012). A continuación, se muestra los posibles reservorios para el virus:

A) Peces de cultivo:

Un brote de la enfermedad no ocasiona necesariamente la mortalidad total, convirtiendo a los sobrevivientes en portadores silenciosos del virus incluso durante 6 años (Reno 1999). El virus es constantemente eliminado por estos portadores, a través de las fecas, orina y productos reproductivos, exponiendo a la infección por el virus a los peces a su alrededor. También implica otro riesgo, la probabilidad de escape de estos portadores asintomáticos, ya que pueden viajar a centros cercanos y contagiar a otros salmónidos de cultivo (Evensen et al. 2003).

B) Peces silvestres:

Se ha detectado un amplio rango de especies de peces silvestres (peces planos como *Limanda limanda*, *Pleuronectes platessa*, *Microstomus kitt*, o peces redondos como *Eutrigla gurnardus*, *Pollachius virens*, *Merluccius merluccius*, entre otros) que pueden actuar como reservorio, aunque con una baja prevalencia del virus, bajo título viral y sin sintomatología clínica, lo que sugiere que se comportan como hospedadores asintomáticos del virus. Este agente es endémico de estos peces marinos, y a la vez, las mismas balsas jaulas de salmónidos actúan como fuente de infección para estas especies silvestres (Wallace et al. 2008).

C) Invertebrados:

Se ha documentado la infección por birnavirus acuáticos en invertebrados marinos, pero esto no asegura el hecho de que estos virus constituyan un riesgo para los peces salmónidos (Evensen et al. 2003). Entre los grupos susceptibles de ser infectados se cuentan los ectoparásitos, organismos planctónicos y organismos bentónicos.

#### D) Aves:

Se ha detectado la presencia de virus IPN en fecas de aves marinas, tales como el pato común y garza. Se sugiere que estos adquieren el virus a partir del consumo de peces de cultivo. A pesar de que se desconoce qué factores medioambientales pueden afectar la estabilidad del virus, el hecho de que se pueda recuperar a partir de fecas de aves piscívoras posiciona a estos organismos como vectores del virus (McAllister & Owens 1992).

#### E) Mamíferos:

Mediante un experimento con vacas, donde se les proporcionó una dieta de ensilado de pescado que contenía virus IPN para, posteriormente, monitorearlo durante 7 días, se encontró que era posible detectar el virus hasta 72 horas después de la alimentación. Esto demostró que el virus era resistente a las enzimas digestivas, a un pH entre 1,1 a 7,5 y a la temperatura corporal de la vaca de 39°C (Smail et al. 1993). Estos autores sugieren un riesgo de propagación del virus a través del estiércol de vaca y posterior escurrimiento a fuentes de agua dulce.

#### F) Agua y sedimentos:

Se ha reportado una larga sobrevivencia del virus IPN en agua dulce, estuarina y salada entre 15 y 20°C, reportándose una reducción del título viral en 3 log<sub>10</sub>, incluso pasadas las 3 semanas (Toranzo & Metricic 1982), aunque su sobrevivencia fuera del hospedador es más larga a bajas temperaturas (Smail et al. 1993). Es por esta resistencia del virus en el agua, que esta constituye una vía de transmisión horizontal del patógeno, ya que los peces infectados con virus IPN constantemente eliminan al agua partículas virales (Evensen et al. 2003).

Por otro lado, se ha podido aislar virus a partir de sedimentos cercanos a sitios donde existen cultivos de salmónidos (Rivas et al. 1993; Labraña et al. 2008), y se comprobó que este puede permanecer activo por lo menos tres semanas (Labraña et al. 2008). Esto evidencia del posible peligro, tanto para especies nativas como de cultivo, que representa el virus almacenado en los sedimentos, por ejemplo, bajo las balsas jaulas.

### ***Factores de riesgo***

A pesar de la importancia del IPN en la salmonicultura a nivel mundial, existen pocos estudios epidemiológicos que investiguen los factores de riesgo que influyen la presentación de cuadros clínicos y brotes de la enfermedad.

En un estudio realizado en Noruega por Jarpt et al. (1994), se identificaron los factores de riesgo en la presentación de brotes de IPN en post-smolts de salmón del Atlántico durante las primeras semanas luego de su traspaso al mar. Del total de 124 sitios analizados, se registraron brotes clínicos de IPN en casi el 40% de los sitios, y la mortalidad asociada con la enfermedad fue sustancial. El estudio reveló que mezclar smolts suministrados desde varios *hatchery* de agua dulce en un mismo centro de cultivo en mar aumentó considerablemente el riesgo de brotes de IPN. Esto se debe, sugieren, al aumento en la posibilidad de introducir peces portadores junto con los grupos no expuestos anteriormente. Otros factores de riesgo asociados con brotes de IPN fueron la antigüedad de los sitios (centros con menor antigüedad de actividad productiva) y la ubicación geográfica de los centros. Por otro lado, estos autores no encontraron relación entre el peso de los smolts en la transferencia de mar ni la fecha de la transferencia con la mortalidad.

Posteriormente Jarpt et al. 1996 determinaron que grupos peces con presencia de anticuerpos específicos contra IPNV (debido a que habían presentado brotes durante la fase de agua dulce), presentaron un mayor riesgo de recurrencia de IPN luego del traspaso al mar al compararlos con los peces del mismo estrato sin anticuerpos específicos. Se ha demostrado también que smolts transferidos al agua de mar a finales de la primavera experimentan un mayor riesgo a IPN durante su fase post smolts en comparación con los transferidos a principio de la temporada (Jarpt & Melby 1997).

En centros de agua dulce, se ha identificado que la presentación de brotes de IPN en clases anuales anteriores es un factor de riesgo significativo para brotes en alevines de primera alimentación de generaciones siguientes, siendo mayor en el primer año siguiente al brote (Jarpt et al 1999). Adicionalmente, se ha demostrado que el uso de agua de mar para mejorar la calidad del agua dulce en estanques de *hatchery* representa un riesgo significativo para la presentación de IPN (Jarpt et al 1999).

En un estudio de caso-control para la identificación de factores de riesgo en brotes clínicos de IPN en centros marinos en Escocia, se reportó que los principales factores de riesgo son el momento en que los smolts son traspasados al mar, el número de fuentes utilizadas para el suministro de smolts y el número total de smolts puestos en mar (>400 mil) (Murray et al. 2004), confirmando lo visto en Noruega anteriormente. En base a los resultados, los autores además sugieren que los smolts deben ser desplegados por carretera y el sitio debe estar distante de las plantas de procesamiento y de otras granjas para disminuir los riesgos. También indican que la remoción frecuente de peces muertos da una cierta protección contra la enfermedad, mientras que la detección de IPNV en el centro está asociada con la presencia de casos.

Ellis (2001) plantea que la baja temperatura se asocia con brotes de IPN debido al efecto sobre la respuesta inmune específica. De acuerdo a Skjesol (2009), además del manejo sanitario y la bioseguridad, un componente significativo que determina si una población de salmónidos desarrolla la enfermedad es la interacción entre el hospedador, el patógeno y el ambiente. Factores como la especie, edad, condición inmunitaria y fisiológica del hospedador; la carga viral en el agua, virulencia de la cepa; temperatura y propiedades químicas del agua, entre otros, son importantes determinantes.

Más recientemente, Jensen & Kristoffersen (2015) analizaron los factores de riesgo que influyen la probabilidad de brotes de IPN y el grado de mortalidad durante los primeros 6 meses de la fase de engorda en centros marinos en Noruega. Los resultados mostraron que el riesgo de brotes de IPN fue mayor para las cohortes de smolts ingresadas al mar en primavera, que para las cohortes ingresadas en Otoño; para salmón del Atlántico versus Trucha arcoíris; y para cohortes en centros con historial previo de IPN. Adicionalmente, el riesgo aumentaba al aumentar el tamaño de la cohorte y la presión de infección (i.e. exposición a la infección por proximidad a centros infectados); mientras que temperaturas más altas y un mayor peso al momento del traspaso al mar disminuía el riesgo, lo que es consistente con los estudios previos realizados en Noruega y Escocia (Jarp et al. 1996; Jarp & Melby 1997; Murray et al. 2004). No obstante, estos autores no encontraron una relación significativa entre el número de proveedores de smolts y la aparición de brotes de IPN. De esta forma, los autores recomiendan como estrategias para evitar y mitigar los brotes IPN el reducir el tamaño de las cohortes (menor densidad de cultivo) y aumentar el peso de los smolts al momento del traspaso al mar, y que este sea durante otoño.

## ***Control y Vacunas***

El control de IPN se ha basado predominantemente en la implementación de medidas zoonosaniatarias y prácticas de higiene en el cultivo de los salmónidos para bloquear la transmisión vertical y horizontal del virus. Estas medidas incluyen controles en el movimiento de peces infectados con IPNV, separación entre unidades de cultivo (en espacio y/o tiempo), testeo y eliminación de prole proveniente de reproductores positivos para IPNV y procedimientos de desinfección y descontaminación (Munro & Midtlyng 2011). Sin embargo, debido a la amplia distribución del virus y los altos costos de las medidas de control, se ha hecho casi imposible impedir la circulación del virus IPN con eficacia y la enfermedad continua afectando a la mayoría de países en donde se realiza la salmicultura. Los viriones de IPNV, además, han mostrado ser altamente resistentes a procedimientos físicos y químicos de desinfección (Munro & Midtlyng 2011), dificultando su remoción desde centros de cultivo infectados y haciendo que la recurrencia de brotes en un mismo centro sea común.

Hasta el momento, no existen tratamientos totalmente efectivos disponibles para IPN, y aunque se han producido vacunas comerciales para la enfermedad, sus efectos son variables y no previenen completamente de las pérdidas (Somerset *et al.* 2005). Dentro de las vacunas comerciales disponibles para IPNV en Canadá, Chile y Noruega, la mayoría corresponden a vacunas de inyección intraperitoneal sub-unitarias (basadas en las proteínas VP2 o VP3) o de virus inactivado (Dhar *et al.* 2014). En 2006, una vacuna oral contra IPN fue autorizada en Chile recomendada para su uso en alevines de salmón del Atlántico saludables, asegurando proteger contra la enfermedad durante al menos 128 días (Munro & Midtlyng 2011). En Noruega también se han iniciado pruebas con esta vacuna, sin embargo, los resultados de estudios de campo tanto en Chile como Noruega no han sido publicados en revistas científicas de revisión por pares, impidiendo una evaluación científica independiente de los resultados.

## ***Resistencia Genética***

Durante las últimas décadas se han hecho esfuerzos en la cría selectiva de peces resistentes al IPN, ya que se ha demostrado que existe una variación genética en la susceptibilidad a la enfermedad tanto salmón del atlántico como en trucha arcoíris (Storset *et al.* 2007; Munro & Midtlyng 2011). Estos avances han sido impulsados, por la falta de resultados en cuanto a las

medidas de prevención empleadas por la industria del salmón, entre ellas las campañas de vacunación y la utilización de desinfectantes. La resistencia a las enfermedades se define como la capacidad de un individuo de neutralizar la amplificación de un patógeno o prevenir su asentamiento. Tradicionalmente, la selección se ha basado en las tasas de supervivencia de los hermanos de candidatos de cría, los cuales son desafiados con la enfermedad, ya que las pruebas directas con los candidatos de reproducción no son posibles debido al riesgo de transmisión vertical del virus. No obstante, el descubrimiento de un loci de carácter cuantitativo o QTL (por sus siglas en inglés, *quantitative trait locus*) para la resistencia a IPN en salmón del atlántico (Houston *et al.* 2008; Moen *et al.* 2009), ha mejorado considerablemente el proceso de determinación genética de resistencia, permitiendo utilizar un criterio de selección que puede ser usado directamente en los candidatos a reproducción. La implementación industrial de este QTL-IPN para una selección asistida por marcadores o MAS (*marker assisted selection*) y producción de salmones resistentes a IPN ha llevado a una reducción considerable de brotes de la enfermedad en centros de cultivo de Noruega durante los últimos años (Moen *et al.* 2015). Sin embargo, aún existe la duda de si el virus pueda superar la resistencia en salmones con QTL-IPN, ya que se han reportado mortalidades por IPN en centros con salmones genéticamente resistentes (Jensen & Kristoffersen 2015). Por otra parte, los desafíos realizados para evaluar la mortalidad en salmones con QTL-IPN han sido llevados a cabo solamente con aislados de la cepa europea Sp (serotipo A2, genogrupo 5) (Storset *et al.* 2007, Houston *et al.* 2008), sin considerar los efectos que puede tener la alta variabilidad genética del virus.

## **Conclusiones y recomendaciones**

Existe gran diversidad y riqueza de información en literatura acerca de la necrosis pancreática infecciosa y su agente etiológico, el virus IPNV, lo que demuestra la importancia de este patógeno y los esfuerzos y recursos que han sido y siguen siendo invertidos para enfrentar el desafío que representa en la salmicultura a nivel mundial. Los estudios más recientes se han centrado en la caracterización molecular y filogenia de aislados del IPNV, en el desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico para la detección y genotipificación del virus, en la virulencia del virus y posibles marcadores moleculares para determinarla, en la interacción patógeno-hospedador y en la respuesta inmune presentada frente a la infección con IPNV, en los factores de riesgo que pueden influenciar la aparición de brotes de IPN, y en la heredabilidad y descubrimiento de

marcadores genómicos para la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, aún existe mucho por investigar en algunas de estas áreas, por ejemplo, la clasificación molecular de los aislados se ha centrado en la secuenciación de la región que codifica para la proteína VP2 (segmento A), no obstante, se ha reportado que puede existir un reordenamiento natural entre dos cepas de Aquabirnavirus en un mismo hospedador, por lo que es necesario la secuenciación de ambos segmentos genómicos para caracterizar de mejor forma los aislados de IPNV. Nuevos estudios filogenéticos que analicen el genoma completo de los aislados podrían confirmar la generación de nuevas cepas del virus producto de este tipo de reordenamiento viral. Con respecto a la relación entre las características filogenéticas de los aislados y su interacción con el hospedador, aunque se ha descrito que existe una relación hospedador-específica de los genogrupos de IPNV identificados en muestras de campo en Chile (genogrupo 1 y 5), esta debe ser confirmada mediante desafíos experimentales que evalúen la mortalidad causada por aislados de ambos genogrupos en las distintas especies de salmónidos cultivadas en el país. En el caso de la virulencia del IPNV, aunque se han identificado marcadores moleculares asociados con altas mortalidades en desafíos experimentales, estos han sido estudiados solo en las cepas del genogrupo 5 (Sp), y muchas veces no se correlacionan con los niveles de mortalidad producidos por aislados de campo causantes de brotes clínicos de IPN sin estos marcadores. Por lo que se ha sugerido, que otros factores genéticos del virus, y/o una combinación de factores ambientales y del hospedador pueden tener un efecto en la virulencia del IPNV, los que requieren de mayor investigación. Con respecto a la epidemiología, existen muy pocos estudios de factores de riesgo para la presentación de brotes de IPN, especialmente en la fase de agua dulce, y aún no es claro si los brotes en esta etapa predisponen a los peces a IPN durante la etapa de engorda en mar. Por lo que es necesario testear dos hipótesis: (1) los alevines sobrevivientes a un brote de IPN siguen hospedando al virus y por lo tanto presentan un mayor riesgo de generar otro brote luego del traspaso al mar, o (2) los alevines sobrevivientes a un brote son inmunes a brotes posteriores. Otro factor que aún requiere investigación, es la utilización de peces con QTL para la resistencia a IPN y su relación con la disminución en el riesgo de brotes de la enfermedad o en la mortalidad asociada a esta, ya que hasta el momento no ha podido ser confirmado estadísticamente que la reducción de brotes en centros de cultivo en Noruega durante los últimos años tenga relación directa con la presencia de los peces con QTL. En esta misma línea, uno de los desafíos próximos en relación a los salmones del Atlántico con QTL, es el identificar el mecanismo funcional responsable de la resistencia a IPN, el cual tiene el potencial de estimular la orientación de otros medios de control de la enfermedad como la vacunación o el tratamiento. Además, también hay una necesidad

de determinar la heredabilidad de la resistencia a IPN y descubrir marcadores genómicos en otras especies de importancia hidrobiológica. De esta forma, la combinación de los efectos de la selección genética para la resistencia a la enfermedad, junto con la implementación de estrategias de mitigación y control en base a la identificación de factores de riesgo y protectivos para la presentación de la enfermedad, y la detección temprana del virus en centros de cultivo en base a nuevas técnicas de diagnóstico más rápidas y sensibles, eventualmente permitirán el control del IPN en la acuicultura a nivel mundial.

## REFERENCIAS REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Referencias Enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa

#### *Indexadas*

- Bragg RR, Combrink ME (1987) Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from rainbow trout in South Africa. Bulletin- European Association of Fish Pathologists 7:118-120
- Espinoza E, Farías G, Soler M, Kuznar J (1985) Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a Chilean isolate. Intervirology 24:58-60
- Jarp J, Gjevre AG, Olsen AB, Bruheim T (1994) Risk-factors for furunculosis, infectious pancreatic necrosis and mortality in post-smolt of atlantic salmon, *salmo-salar* l. Journal of Fish Diseases 18:67-78
- Kirsinger MI, Cifuentes F, Everitt E, Kuznar J (1999) Detection of infected trout by an immunodot assay. Bulletin of the European Association of Fish Pathologist 19(1):31-35.
- McAllister PE, Reyes X (1984) Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* richardson, imported into Chile. Journal of Fish Diseases 7:4
- M'Gonigle RH (1941) Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. Transactions of the American Fisheries Society 70:297-303
- Munro ES, Midtlyng PJ (2011) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) Fish diseases and disorders volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. CABI, p 1-65

- Noguera PA, Bruno DW (2010). Liver involvement in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): a retrospective histopathological study. *Journal of Fish Diseases*, 33, 819–832
- Reno PW (1999) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Bruno WPD (ed) *Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal infections*, Vol 3. CABI Publishing, New York, p 1-56
- Rønneseth A, Wergeland HI, Devik M, Evensen Ø, Pettersen EF (2007) Mortality after ipnv challenge of atlantic salmon (*Salmo salar* l.) differs based on developmental stage of fish or challenge route. *Aquaculture* 271:100-111
- Roberts RJ, Pearson MD (2005) Infectious pancreatic necrosis in atlantic salmon, *salmo salar* l. *J Fish Dis* 28:383-390
- Rodriguez Saint-Jean S, Borrego J, Pérez-Prieto SI (2003) Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis and diagnostic methods. *Advances in Virus Research* 62: 113-165.
- Smail DA, Bain N, Bruno DW, King JA and others (2006) Infectious pancreatic necrosis virus in atlantic salmon, *Salmo salar* l., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: Virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with scottish mainland isolates. *J Fish Dis* 29:31-41
- Vega LF, Montes de Oca R, Valladares B, Martínez-Castañeda S, Alonso U, Enríquez R, Ortega C (2011). Evaluación de la respuesta clínico-patológica e inmune humoral en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas experimentalmente con el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV). *Archivos de Medicina Veterinaria* 43:27-34.
- Wolf K, Snieszko SF, Dunbar CE, Pyle E (1960) Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 104:105-108

### ***No indexadas***

- Campalans M, Rojas P, Campalans J, Guerrero I (2002) Técnicas de diagnóstico de enfermedades de salmónidos, mitílidos, pectínidos y ostreídos. Proyecto FIP N° 2001 – 09.
- Fridholm H (2008) Infectious pancreatic necrosis virus. Immunogenicity, virion integrity and virus/cell interaction. Doctoral Dissertation in Microbiology, Department of Cell and Organism Biology, Lund University, Lund.

- Maret J (1997) Virulence Characteristics of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) in Brook Trout. *Salvelinus fontinalis* Fry. Thesis for the degree of Master of Science in Fisheries Science, Oregon State University.
- McAllister PE (1983) Infectious pancreatic necrosis (ipn) of salmonid fishes. In: INTERIOR USDOT (ed), Washington, D. C., p 12
- McCull KA, Davies KR, Young JG, Crane M (2009) Aquatic birnavirus infections of finfish. In: Australia and new zealand standard diagnostic procedure. Sub-Committee on Animal Health Laboratory Standards
- OIE (2006) Manual of diagnostic tests for aquatic animals. In: Health WOFA (ed), Paris, p 469 pp.
- Pinto J, Herrera J, Zagmutt F, Urcelay Sand others (2003) Riesgo de introducción de enfermedades infectocontagiosas en salmonidos. Proyecto FIP 2001-08
- Sernapesca (2014) Informe sanitario salmonicultura en centros marinos primer semestre 2014. In: Sernapesca (ed), p 34
- Skjesol A (2009) Studies of infectious pancreatic necrosis virus (ipnv) and immune evasion strategies. A dissertation for the degree of philosophiae doctor. Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, University of Tromsø

## **Referencias Agente etiológico**

### ***Indexadas***

- Akhlaghi M & Hosseini A. (2007). First report on the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by RT-PCR in rainbow trout fry cultured in Iran. Bulletin-european association of fish pathologists, 27(5), 205.
- Bain N, Gregory A, Raynard RS (2008) Genetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus from Scotland. Journal of Fish Diseases 31:37-47
- Barrera-Mejía M, Simon-Martinez J, Ulloa-Arvizu R, Salgado-Miranda C, Soriano-Vargas E (2010) Molecular characterization of the VP1 gene of a mexican isolate of infectious pancreatic necrosis virus. Can J Vet Res 74:218-222
- Blake S, Ma JY, Caporale DA, Jairath S, Nicholson BL (2001) Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment a cDNA. Dis Aquat Organ 45:89-102

- Bruslind LD, Reno PW (2000) Virulence comparison of three buhl-subtype isolates of infectious pancreatic necrosis virus in brook trout fry. *Journal of Aquatic Animal Health (OIE)* 12:301-315
- Caswell-Reno P, Reno PW, Nicholson BL (1986) Monoclonal antibodies to infectious pancreatic necrosis virus: Analysis of viral epitopes and comparison of different isolates. *The Journal of general virology* 67 ( Pt 10):2193-2205
- Christie KE, Håvarstein LS, Djupvik HO, Ness S, Endresen C (1988) Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Atlantic salmon. *Archives of Virology* 103:167-177
- Cutrin JM, Barja JL, Nicholson BL, Bandin I, Blake S, Dopazo CP (2004) Restriction fragment length polymorphisms and sequence analysis: An approach for genotyping infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnaviruses isolated from northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1059-1067
- Cutrin JM, López-Vázquez C, Oliveira JG, Castro S, Dopazo CP & Bandin I. (2005). Isolation in cell culture and detection by PCR-based technology of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of fish diseases*, 28(12), 713-722.
- Dadar M, Peyghan R, Memari HR, Shapouri MR, Hasanzadeh R, Goudarzi LM, Vakharia VN (2013) Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus isolated from iranian reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2012. *Virus genes* 47:574-578
- Dadar M, Peyghan R, Rajabi-Memari H, Seifi Abad Shapouri M, Hasanzadeh R, Moazzami Goudarzi L & Vakharia V (2014). Phylogenetic relationships of Iranian Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) based on deduced amino acid sequences of genome segment A and B cDNA. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(3), 560-575.
- Davies KR, McColl KA, Wang LF, Yu M, Williams LM, Crane MS (2010) Molecular characterisation of australasian isolates of aquatic birnaviruses. *Dis Aquat Organ* 93:1-15
- Dixon PF, Ngoh GH, Stone DM, Chang SF, Way K, Kueh SLF (2008) Proposal for a fourth aquabirnavirus serogroup. *Archives of Virology* 153:1937-1941
- Dobos P (1977) Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology* 21:242-258
- Dobos P (1995) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases* 5:25-54

- Duncan R, Nagy E, Krell PJ, Dobos P (1987) Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment a coding regions. *J Virol* 61:3655-3664
- Eissler Y, Pavlov MS, Conejeros P, Espinoza JC, Kuznar J (2011) Detection and quantification of Chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time RT-PCR assays using segment B as a target. *Lat Am J Aquat Res* 39:9
- Espinoza E, Farías G, Soler M, Kuznar J (1985) Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a Chilean isolate. *Intervirology* 24:58-60
- Glenney GW, Barbash PA, Coll JA & Quartz WM (2012). Isolation and molecular characterization of a novel infectious pancreatic necrosis virus strain in returning Atlantic salmon *Salmo salar* from the Connecticut River, USA. *J Aquat Anim Health*, 24(2), 63-72.
- Guerrero L, Herrera E, Salinas J, Torres Jand others (2008) Detection and genotyping of an infectious pancreatic necrosis virus from asymptomatic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) facilities in Mexico. *Intervirology* 51:285-292
- Heppell J, Berthiaume L, Tarrab E, Lecomte J, Arella M (1992) Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *Journal of General Virology* 73:2863-2870
- Hill BJ, Way K (1995) Serological classification of infectious pancreatic necrosis (ipn) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Diseases* 5:55-77
- Joh SJ, Shon CI, Kang SW, Kim BHand others (2008) Molecular characterization and genogrouping of VP1 of aquatic birnavirus GC1 isolated from rockfish *Sebastes schlegeli* in Korea. *J Vet Sci* 9:85-90
- John KR, Richards RH (1999) Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *The Journal of general virology* 80 ( Pt 8):2061-2065
- Julin K, Mennen S & Sommer AI (2013) Study of virulence in field isolates of infectious pancreatic necrosis virus obtained from the northern part of Norway. *Journal of Fish Diseases*, 36(2), 89-102
- Kelly RK, Loh PC (1972) Electron microscopical and biochemical characterization of infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 10:824-834.
- Lago M, Bandín I, Oliveira JG & Dopazo CP (2017). In vitro reassortment between Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) strains: The mechanisms involved and its effect on virulence. *Virology*, 501, 1-11.

- Lee MK, Blake SL, Singer JT, Nicholson BL (1996) Genomic variation of aquatic birnaviruses analyzed with restriction fragment length polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2513-2520
- Liu M, Vakharia VN (2004) VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology* 330:62-73
- Lvov DK, You M, Shchelkanov SV, Deryabin PG (2015) Double-stranded rna viruses. In: Inc. E (ed) *Zoonotic viruses of northern eurasia taxonomy and ecology*, London
- Maraver A, Oña A, Abaitua F, González Dand others (2003) The oligomerization domain of vp3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *Journal of Virology* 77:6438-6449
- McAllister PE, Reyes X (1984) Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, *salmo gairdneri richardson*, imported into chile. *Journal of Fish Diseases* 7:4
- McCowan C, Motha J, Crane MJ, Moody NJG, Cramer S, Hyatt A, Bradley T (2015) Isolation of a novel aquatic birnavirus from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Australia. *Dis Aquat Organ* 114:115-125
- Mladineo I, Zrnčić S, Lojkić I & Oraić, D. (2011). Molecular identification of a new strain of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in a Croatian rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farm. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(5), 1165-1168.
- Mohr PG, Moody NJG, Williams LM, Hoad J, Crane MJ (2015) Molecular characterization of Tasmanian aquabirnaviruses from 1998 to 2013. *Dis Aquat Organ* 116:1-9
- Munro ES, Midtlyng PJ (2011) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish diseases and disorders volume 3: Viral, bacterial and fungal infections*. CABI, p 1-65
- Mutoloki S, Evensen O (2011) Sequence similarities of the capsid gene of chilean and european isolates of infectious pancreatic necrosis virus point towards a common origin. *Journal of General Virology* 92:1721-1726
- Mutoloki S, Jøssund TB, Ritchie G, Munang'andu HM & Evensen Ø (2016). Infectious pancreatic necrosis virus causing clinical and subclinical infections in Atlantic salmon have different genetic fingerprints. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Nishizawa T, Kinoshita S, Yoshimizu M (2005) An approach for genogrouping of japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, vii, based on the vp2/ns junction region. *Journal of General Virology* 86:1973-1978

- Nobiron I, Galloux M, Henry C, Torhy C et al (2008) Genome and polypeptides characterization of tellina virus 1 reveals a fifth genetic cluster in the birnaviridae family. *Virology* 371:350-361
- Parmaksiz A, Sait A & Gürçay S (2014) Determination of Nucleotide Partial Sequence of VP2 Region of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Isolated from Ovarian Fluid of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) in Turkey.
- Reno PW (1999) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Bruno WPD (ed) *Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal infections*, Vol 3. CABI Publishing, New York, p 1-56
- Romero-Brey I, Bandín I, Cutrín JM, Vakharia VN, Dopazo CP (2009) Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* 32:585-595
- Ruane NM, McCarthy LJ, Swords D, Henshilwood K (2009) Molecular differentiation of infectious pancreatic necrosis virus isolates from farmed and wild salmonids in Ireland. *Journal of Fish Diseases* 32:979-987
- Ruane NM, McCleary SJ, McCarthy LJ, Henshilwood K (2015) Phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Ireland reveals the spread of a virulent genogroup 5 subtype previously associated with imports. *Arch Virol* 160:817-824
- Tarrab E, Berthiaume L, Heppell J, Arella M, Lecomte J (1993) Antigenic characterization of serogroup 'A' of infectious pancreatic necrosis virus with three panels of monoclonal antibodies. *The Journal of general virology* 74 ( Pt 9):2025-2030
- Salgado-Miranda C, Rojas-Anaya E, García-Espinosa G & Loza-Rubio E (2014). Molecular Characterization of the VP2 Gene of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Isolates from Mexico. *J Aquat Anim Health*, 26(1), 43-51.
- Sano M, Okamoto N, Fukuda H, Saneyoshi M, Sano T (1992) Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment-A). *Journal of Fish Diseases* 15:283-293
- Santi N, Song H, Vakharia VN, Evensen O (2005) Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *Journal of Virology* 79:9206-9216
- Santi N, Vakharia VN, Evensen Ø (2004) Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322:31-40

- Shivappa RB, Song H, Yao K, Aas-Eng A, Evensen O, Vakharia VN (2004) Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Dis Aquat Organ* 61:23-32
- Skjesol A, Skjæveland I, Elnæs M, Timmerhaus G, Fredriksen BN, Jørgensen SM, Krasnov A & Jørgensen JB (2011) IPNV with high and low virulence: host immune responses and viral mutations during infection. *Virology journal*, 8(1), p.1.
- Smail DA, Bain N, Bruno DW, King JA et al. (2006) Infectious pancreatic necrosis virus in atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, scotland: Virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with scottish mainland isolates. *J Fish Dis* 29:31-41
- Song H, Santi N, Evensen O, Vakharia VN (2005) Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *Journal of Virology* 79:10289-10299
- Tapia D, Eissler Y, Torres P, Jorquera E, Espinoza JC, Kuznar J (2015) Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 116(3), 173-184.
- Underwood BO, Smale CJ, Brown F, Hill BJ (1977) Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *The Journal of general virology* 36:93-109
- Vardić I, Kapetanović D, Valić D, Kurtović B, Teskeredžić Z, & Teskeredžić E (2007). Genotyping of isolated viruses from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Croatia. *Croatian Journal of Fisheries*, 65(3), 87-97.

### ***No indexadas***

- Calderón Y (1998). Determinación de la virulencia de dos cepas del virus IPN en *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*. Tesis para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. 37 pp.
- Fernández M (2005) Estudio epidemiológico del virus de la necrosis pancreática infecciosa en salmones: Tipificación molecular de los distintos serotipos existentes en Chile. Tesis de Bachiller, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 73 pp.
- Fridholm H (2008) Infectious pancreatic necrosis virus. Immunogenicity, virion integrity and virus/cell interaction. Doctoral Dissertation in Microbiology, Department of Cell and Organism Biology, Lund University, Lund.

## Referencias Técnicas de Diagnóstico

### *Indexadas*

- Chamorro, C., Espinoza, J. C., Soto, K., & Kuznar, J. (2006). Concentración del virus de la necrosis pancreática infecciosa mediante ultrafiltración de flujo tangencial combinado con filtración de exclusión. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(1), 77-82.
- Chang N, MacDonald D, Yamamoto T (1978) Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Canadian Journal of Microbiology* 24: 19-27.
- Cifuentes F, Puelle C, Espinoza JC, Cisternas C, Enríquez R, Kuznar J (1999) Utilización de un anticuerpo monoclonal en el diagnóstico directo e indirecto del virus IPN en peces infectados experimentalmente. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 31(2): 219-229.
- Condit R (2007) Principles of virus structure. En: Knipe D & P Howley (eds), *Fields Virology* vol 1: 25-57. Wolters Klumer, Philadelphia.
- Dixon PF, Hill BJ (1983). Rapid Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) by the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Journal of General Virology* 64(2): 321-330.
- Dobos P (1995) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (ipnv). *Annual Review of Fish Diseases* 5:25-54
- Dobos P (1977) Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Virology* 21:242-258
- Ellis AE (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 827-839.
- Espinoza, JC., Hjalmarsson, A., Everitt, E., & Kuznar, J. (2000). Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. *Archives of virology*, 145(4), 739-748.
- Espinoza J, Kuznar J (2002) Rapid simultaneous detection and quantification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Journal of Virological Methods* 105: 81-85.
- Espinoza JC, Kuznar J (2010) Visualization of the infectious pancreatic necrosis virus replication cycle by labeling viral intermediates with a TUNEL assay. *Vet Microbiol.* 14;143(2-4):101-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.11.007. 2010 Jul. Epub 2009 Dec 5.

- Evensen O. & Rimstad E. (1990). Immunohistochemical identification of infectious pancreatic virus in paraffin-embedded tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Vet. Diagn. Invest., 2, 288–293.
- Kelly RK, Loh PC (1972) Electron microscopical and biochemical characterization of infectious pancreatic necrosis virus. J Virol 10:824-834.
- Kennedy J, MacDonald R (1982) Persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus mediated by defective-interfering (DI) virus particles in a cell line showing strong interference but little DI replication. Journal of General Virology 58: 361-371.
- Lorenzen E, Carstensen B, Jorgen Olesen N (1999) Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. Diseases of Aquatic Organisms 37: 81-88.
- Ørpetveit I, Mikalsen AB, Sindre H, Evensen Ø, Dannevig BH, Midtlyng PJ (2010) Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in subclinically infected Atlantic Salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 22: 886.
- Rimstad E, Hornes E, Olsvik Ø, Hyllseth B (1990) Identification of a Double-Stranded RNA Virus by Using Polymerase Chain Reaction and Magnetic Separation of the Synthesized DNA Segments. Journal of Clinical Microbiology. 28(10):2275-2278
- Reno PW (1999) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Bruno WPD (ed) Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal infections, Vol 3. CABI Publishing, New York, p 1-56
- Rodriguez Saint-Jean S, Borrego JJ, Perez-Prieto SI (2001) Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. Journal of Virological Methods 97:23–31.
- Rodriguez Saint-Jean S, Borrego J, Pérez-Prieto SI (2003) Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis and diagnostic methods. Advances in Virus Research 62: 113-165.
- Tu K, Spendlove R, Goede R (1974) Immunofluorescent Cell Assay of Infectious pancreatic necrosis virus. Applied Microbiology 27 (3): 593-599.
- Vázquez D, Cutrín JM, Olveira JG & Dopazo CP (2016). Design and validation of a RT - qPCR procedure for diagnosis and quantification of most types of infectious pancreatic necrosis virus using a single pair of degenerated primers. Journal of Fish Diseases.

### *No indexadas*

OIE (2006) Manual of diagnostic tests for aquatic animals. In: Health WOFA (ed), Paris, p 469 pp.

## **Referencias Epidemiología y Control**

### *Indexadas*

- Bootland LM, Dobos P, Stevenson RMW (1991) The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 10:13-21
- Bullock, GL, Rucker, RR, Amend, D, Wolf, K, & Stuckey, HM (1976). Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine-treated and nontreated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33(5), 1197-1198.
- Dhar, A. K., Manna, S. K., & Allnutt, F. T. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *VirusDisease*, 25(1), 1-17.
- Dixon PF, Smail DA, Algoët M, Hastings TS et al (2012) Studies on the effect of temperature and pH on the inactivation of fish viral and bacterial pathogens *Journal of Fish Diseases* 35:14
- Ellis AE (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25, 827-839.
- Houston, R. D., C. S. Haley, A. Hamilton, D. R. Guy, A. E. Tinch et al., (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics* 178: 1109–1115.
- Jensen, B. B., & Kristoffersen, A. B. (2015). Risk factors for outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) and associated mortality in Norwegian salmonid farming. *Diseases of aquatic organisms*, 114(3), 177-187.
- Jarp J, Gjevre AG, Olsen AB, Bruheim T (1994) Risk-factors for furunculosis, infectious pancreatic necrosis and mortality in post-smolt of Atlantic salmon, *Salmo-salar* L. *Journal of Fish Diseases* 18:67-78
- Jarp J, Taksdal, T, & Tørud, B. (1996). Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon *Salmo salar* in relation to specific antibodies, smoltification, and infection with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). *Diseases of aquatic organisms*, 27(2), 81-88.

- Jarp J (1999). Epidemiological aspects of viral diseases in the Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 19(6), 240-244.
- Labraña R, Espinoza J, Kuznar J (2008) Detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en sedimentos de agua dulce. Archivos de medicina veterinaria 40:203-205
- McAllister PE, Owens WJ (1992) Recovery of infectious pancreatic necrosis virus from the faeces of wild piscivorous birds. Aquaculture 106:227-232
- Moen, T., M. Baranski, A. K. Sonesson, and S. Kjøglum, (2009) Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. BMC Genomics 10: 368.
- Moen, T., Torgersen, J., Santi, N., Davidson, W. S., Baranski, M., Ødegård, J., Kjøglum S., Velle B., Kent M., Lubieniecki KP., Isdal E., Lien S (2015). Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. Genetics, 200(4), 1313-1326.
- Mortensen SH, Nilsen RK, Hjeltnes B (1998) Stability of an infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolate stored under different laboratory conditions. Dis Aquat Organ 33:67-71
- Murray A (2006). Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Scottish salmon (*Salmo salar* L.) farms. Preventive Veterinary Medicine 76(1-2): 97-108.
- Reno PW (1999) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Bruno WPD (ed) Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal infections, Vol 3. CABI Publishing, New York, p 1-56
- Rivas C, Cepeda C, Dopazo CP, Novoa B, Noya M, Barja JL (1993) Marine environment as reservoir of birnaviruses from poikilothermic animals. Aquaculture 115:183-194
- Smail DA, Huntly PJ, Munro ALS (1993) Fate of four fish pathogens after exposure to fish silage containing fish farm mortalities and conditions for the inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. Aquaculture 113:9
- Smail DA, Munro ES (2008) Isolation and quantification of infectious pancreatic necrosis virus from ovarian and seminal fluids of atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 31:49-58
- Sommerset, I., B. Krossøy, E. Biering, and P. Frost, (2005) Vaccines for fish in aquaculture. Expert Rev. Vaccines 4: 89–101.
- Storset, A., C. Strand, M. Wetten, S. Kjøglum, and A. Ramstad, (2007) Response to selection for resistance against infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 272: S62–S68.

- Toranzo AE, Metricic FM (1982) Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *Journal of Fish Diseases* 5:223-231
- Wallace IS, Gregory A, Murray AG, Munro ES, Raynard RS (2008) Distribution of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in wild marine fish from scottish waters with respect to clinically infected aquaculture sites producing atlantic salmon, *salmo salar* L. *J Fish Dis* 31:177-186
- Whipple MJ, Rohovec JS (1994) The effect of heat and low pH on selected viral and bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 123:179-189

*No indexadas*

- Evensen Ø, Stagg R, Brun E, Midtlyng P, Rimstad E, Skjelstad B, Johanssen LH, Jense I (2003) IPNV in salmonids: a review, 115 pp. Fisheries and Aquaculture Industries Research Fund, Oslo.
- Jarp J & Melby H. (1997). A prospective study of infectious pancreatic necrosis in farmed atlantic salmon post-molt (Vol. ISVEE 8: Proceedings of the 8th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Paris, France.
- Murray AG, Leschen WA, Kilburn R & Raynard RS (2004). A case-control study for the identification of risk factors behind clinical outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN). Fisheries Research Services Scotland Internal Report, (06/04).
- Skjesol A (2009) Studies of infectious pancreatic necrosis virus (ipnv) and immune evasion strategies. A dissertation for the degree of philosophiae doctor. Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, University of Tromsø

## RESULTADOS OBJETIVO 2: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS VIRALES

### Muestreos en Terreno

Se realizaron 26 muestreos en terreno, cuya información se encuentra contenida en la Tabla 6, 18 corresponden a pisciculturas y 8 a centros de mar, distribuidos entre la Región del Bio-Bio y la de Magallanes (Figura 12). De estos muestreos, 20 son de la especie *S. salar*, 3 de *O. kisutch* y 3 de *O. mykiss*, 10 de ellos corresponden a alevines, 12 a smolt y 4 a peces adultos. De los 26 centros muestreados, se recibieron 53 muestras, correspondientes a 2 muestras por cada centro, excepto para PMLC del cual se recibieron 3. Cada muestra se compone de un pool conformado por cinco peces, con la excepción de PERA cuyos pools se conformaron con 10 peces, ya que el manual de muestreo así lo estipula para peces de tamaño inferior a 4 cm. En total se recibieron 305 peces, conformando 53 pools como unidad de muestreo.

Los centros Chayahue (ASKR, SLND, IFGF), Fiordo Aysén (IPFA, IPFA2°) y James (CKBG, CMOO) se muestrearon más de una vez. Se muestreo nuevamente Chayahue, ya que se presentó otro brote a mitad del 2016 y Fiordo Aysén y James para asegurarse de obtener positividad en el muestreo y lograr el aislamiento de virus, ya que se pensó podría haber un problema de sensibilidad y se presentó la posibilidad de re-muestrear estos centros. Se hicieron las consultas a la empresa dueña del centro Chayahue para seguir una cohorte a partir del segundo brote muestreado, sin embargo, debido a la dificultad que esto presentaba (identificación de los grupos al momento de salir de la piscicultura), al poco tiempo restante en la ejecución del proyecto y a que la empresa no respondió a este requerimiento, no se logró llevar a cabo esta actividad. En el segundo informe, página 14 en la sección de respuesta “aspectos de contenido” a las observaciones realizadas por el evaluador al primer informe, se hace relación a este hecho y se justifica de manera extensa.

Tabla 6. Información de los muestreos realizados durante la ejecución del proyecto.

Fecha Muestreo	Código Muestreo	Centro	Tipo Centro	Región	Ubicación	Especie	Estado de desarrollo	Pools conformados	Nº de peces muestreados
20-08-15	<b>CHMD</b>	110731 Elefante Sur	Mar	XI	Bahía Nauto Isla Traiguen, Aysen	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2	10
20-08-15	<b>SFAA</b>	100447 Cholgo (3)	Mar	X	Rada Potreros de Cholgo, Los Lagos	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
04-02-16	<b>GMTS</b>	100093 Puerto Claro	Río	XIV	Entre Punta Claro y Puyehue, Isla del Rey	<i>O. kisutch</i>	Smolt	2	10
10-02-16	<b>SFJL</b>	103957 Piscicultura Chaparano	Tierra (Mixta)	X	Estuario Reloncavi, Chaparano	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
15-02-16	<b>RTTX</b>	101851 Rupanco II	Lago	X	Peninsula, Lago Rupango	<i>O. kisutch</i>	Smolt	2	10
16-02-16	<b>ASKR</b>	104051 Chayahue	Tierra (Recirculación)	X	Punta Tique, Chayahue	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
23-02-16	<b>HYBS</b>	100546 Puerto Fonck	Lago (Abierta)	X	Lago Llanquihue, Bahía Fonk	<i>O. kisutch</i>	Smolt	2	10
25-04-16	<b>QHPP</b>	102744 Piscicultura Rauco	Tierra (Recirculación)	X	Rauco, Estero Castro	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
04-05-16	<b>FHON</b>	104055 Novofish	Tierra (Abierta)	X	Punta Concha Blanca, Huelmo	<i>Salmo salar</i>	Alevin	2	10

Continuación Tabla 6

04-05-16	<b>PMLC</b>	90085 Molco	Tierra (Mixta)	IX	Molco Alto	<i>Salmo salar</i>	Alevin	3	15
20-05-16	<b>SLND</b>	104051 Chayahue	Tierra (Recirculación)	X	Punta Tique, Chayahue	<i>Salmo salar</i>	Alevin	2	40
25-05-16	<b>PPVD</b>	102763 Pullinque	Tierra (Abierta)	XIV	Pullinque	<i>Salmo salar</i>	Alevin	2	10
10-06-16	<b>IFGF</b>	104051 Chayahue	Tierra (Recirculación)	X	Punta Tique, Chayahue	<i>Salmo salar</i>	Alevin	2	10
13-06-16	<b>IPFA</b>	110869 Fiordo Aysén	Tierra (mixta)	XI	Rodado Notable del Fiordo Aysén	<i>Salmo salar</i>	Alevin	2	10
07-07-16	<b>JGHL</b>	100203 Pichichanleufu	Tierra (mixta)	X	Rio Pichichanleufu	<i>Salmo salar</i>	Alevin	2	10
12-07-16	<b>PRBE</b>	140011 Piscicultura Río Bueno	Tierra (Abierta)	XIV	Fundo Los Chilcos	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
25-07-16	<b>IPFA(2º)</b>	110869 Fiordo Aysén	Tierra (mixta)	XI	Rodado Notable del Fiordo Aysén	<i>Salmo salar</i>	Alevin	2	10
08-08-16	<b>ANEP</b>	102140 Punta Quielen	Mar (Recirculación)	X	Sur Punta Queilen, Canal Queilen	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2	10
23-08-16	<b>PERA</b>	80074 Peral	Tierra (Abierta/Recirculación)	VIII	El peral, sector Santa Laura	<i>O. mykiss</i>	Alevin	2	20

Continuación Tabla 6

12-09-16	<b>PLNO</b>	1120111 Punta Laura Norte	Mar	XII	Seno Skyring, Norte de Punta Laura	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2	10
10-10-16	<b>CKBG</b>	110648 James	Mar	XI	Norte Canal Goñi, Isla James	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
25-10-16	<b>TAMB</b>	140002 Los Tambores	Tierra (Abierta)	XIV	Rio Bueno	<i>O. mykiss</i>	Alevin	2	10
07-11-16	<b>EKLT</b>	102183 Ducañas	Mar	X	Noroeste Isla Aullín	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
08-11-16	<b>CMOO</b>	110648 James	Mar	XI	Norte Canal Goñi, Isla James	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2	10
09-11-16	<b>IGHF</b>	110035 Islote Grupo Herrera	Mar	XI	Noroeste Punta Victoria, Isla Churrecue	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2	10
23-11-16	<b>RPCO</b>	101707 Rupanco	Lago	X	Lago Rupanco	<i>O. mykiss</i>	Smolt	2	10

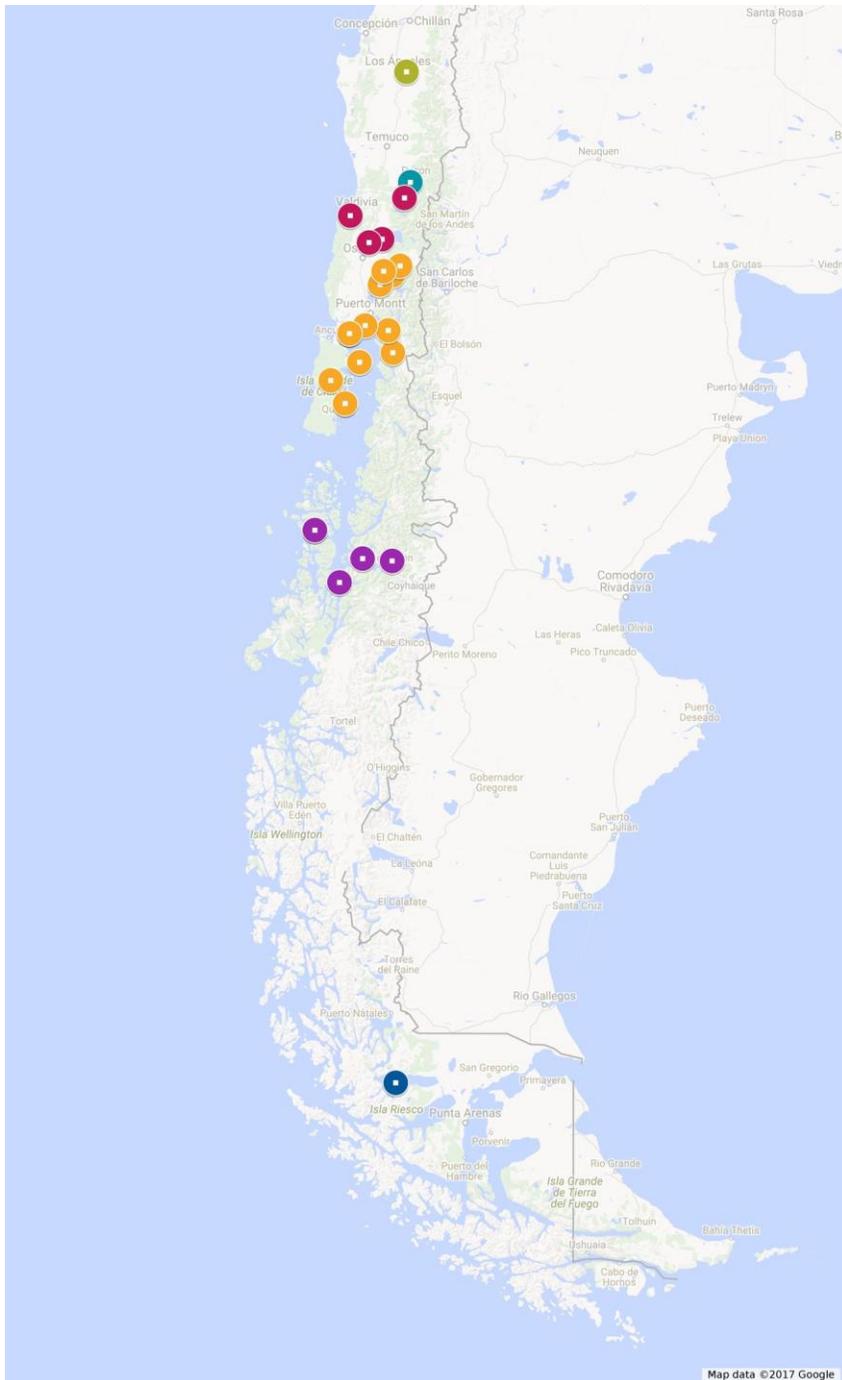


Figura 12. Mapa que muestra la distribución de los centros muestreados durante el proyecto. Símbolos indican ● : Región del Bío-Bío, ● : Región de la Araucanía, ● : Región de los Ríos, ● : Región de los Lagos, ● : Región de Aysén, ● : Región de Magallanes.

## Mortalidad por IPN de los Centros Muestreados

La Tabla 7 y Figura 13 resumen la información de los brotes de IPN registrados en los sitios muestreados. En la Tabla 7 se muestra la información recopilada mediante la ficha de muestreo y la obtenida según las bases de datos de mortalidad entregadas por Sernapesca para cada uno de los muestreos. Se puede observar que, según lo reportado en la ficha de muestreo, en muchos casos el muestreo se llevó a cabo durante la presentación del brote de IPN, por lo que la fecha de término del brote no era conocida por el encargado al momento de llenar la ficha, ya que aún se encontraba en curso (e.g. SFAA, FHON, PPVD, IFGF, PRBE, PERA, PLNO, TAMB, EKL, IGHF, RPCO). Por lo mismo, las mortalidades reportadas en la ficha de muestreo también corresponden a porcentajes parciales del brote, y las acumuladas son solo hasta el momento del muestreo. Debido a esto, se analizaron las bases de datos entregadas por Sernapesca para conocer el comienzo, el final y la mortalidad total asociada al brote de IPN en cada uno de los centros muestreados (Figura 13). Cabe destacar que en algunos centros muestreados (CKBG, CMOO) no se presentó un brote de IPN (i.e. sin mortalidad semanal mayor al 0,02% en alguna de las unidades de cultivo), o se había presentado con mucha anterioridad al muestreo (QHPP), por lo que no se registran datos para estos centros. Por otro lado, algunos centros presentaron brotes con anterioridad al muestreo, pero aún registraban hallazgos asociados a la enfermedad al momento de la toma de muestras. En estos casos se registran los datos del brote, pero se puede observar que el porcentaje de mortalidad asociado a IPN durante la semana del muestreo es 0 (HYBS, IPFA, JGHL) (Tabla 7).

Con respecto a la duración de los brotes, estos fueron desde solo una semana (SFJL) hasta 18 semanas con mortalidades semanales mayores al 0,02% en alguna de las unidades de cultivo del centro (SLND, IFGF) (Tabla 7).

Con respecto a las mortalidades asociadas a la enfermedad, los rangos fueron de 175 (SFJL) a 250.912 peces (SLND, IFGF) en la mortalidad total acumulada durante el brote, y de 0.02% (SFJL) a 13.49% (GMTS) en la mortalidad semanal máxima por unidad de cultivo durante el brote. Por lo tanto, se puede observar que el centro Chayahue, tuvo los valores más altos, con una mortalidad total de 250.912 peces durante las 18 semanas que duró el brote, tiempo en el cual se realizaron los muestreos SLND e IFGF. Mientras que el porcentaje de mortalidad semanal máximo reportado para una unidad de cultivo (13,49%) se registró en el centro Puerto Claro (GMTS) en donde el brote tuvo una duración de 5 semanas y una mortalidad acumulada de 231.432 peces (Tabla 7 y Figura 13).

Es importante recalcar, que aunque en algunos centros la mortalidad por IPN se presentó en más de una unidad de cultivo por semana, para los valores de porcentajes de mortalidad semanal obtenidos desde la base de datos solo se consideró el valor de la unidad con mayor mortalidad durante la semana analizada.

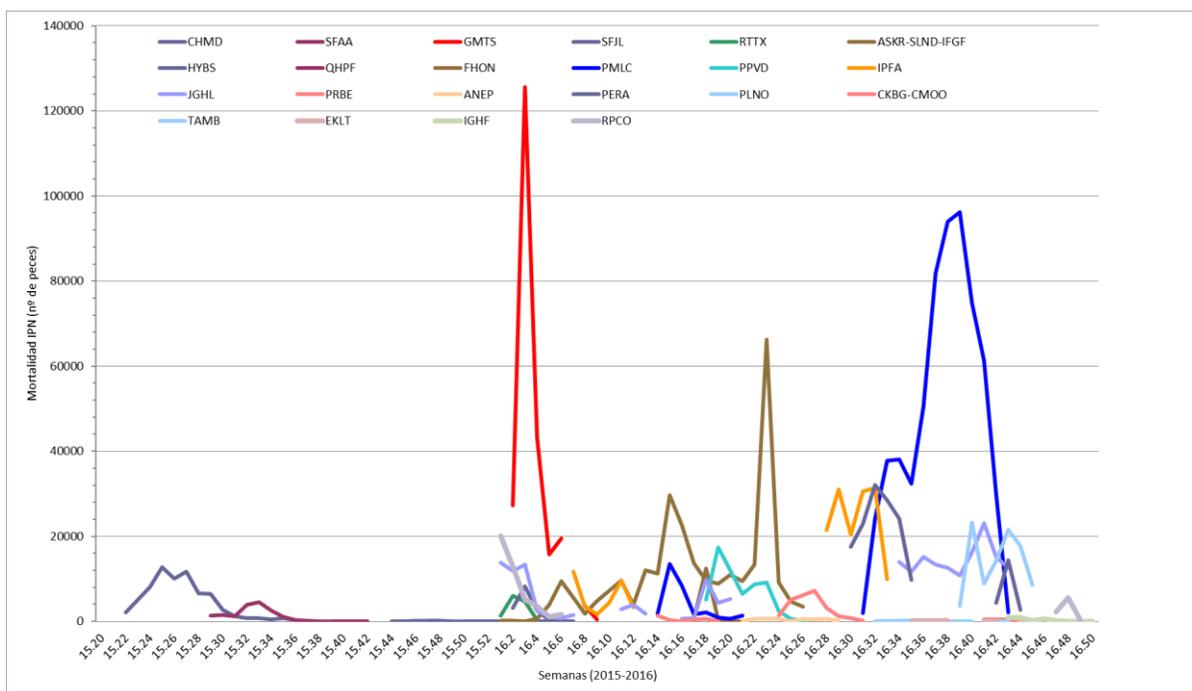


Figura 13. Mortalidad total asociada a IPN en los centros muestreados desde la semana 20 del 2015 a la semana 50 del 2016.

Tabla 7. Mortalidad asociada a IPN reportada en la ficha de muestreo y de acuerdo a la base de datos entregada por Sernapesca.

Fecha Muestreo	Código Muestreo	Reportado en Ficha de Muestreo		Base de datos Sernapesca				
		Fecha Brote (Inicio-Término)	% Mortalidad IPN (Diaria/Semanal/Acumulada al brote)	Comienzo Brote	Término Brote	% mortalidad semanal IPN máximo	% mortalidad semanal IPN muestreo	Mortalidad Total Brote IPN
20-08-15	CHMD	18.05.2015 (por parte del centro) - semana 32	0,05/ 0,364/ 6,873 (de acuerdo a clasificación del centro)	Sem 22 (25.05.15 - 31.05.15)	Sem 36 (31.08.15 - 6.09.15)	4,32	0,32	70.120
20-08-15	SFAA	14.07.2015 - persiste mortalidad por la causa	0,05/ 0,36/ 2,16	Sem 29 (13.07.15 - 19.07.15)	Sem 37 (7.09.2015 - 13.09.2015)	2,21	1,11	16.735
04-02-16	GMTS	13.01.2016 - 29.01.2016	0,06-0,90/ 0,39-2,78/ 3,9	Sem 2 (11.01.16 - 17.01.16)	Sem 6 (8.02.16 - 14.02.16)	13,49	1,9	231.432
10-02-16	SFJL	10.10.2015 - siguen los hallazgos	0,0003/0,008/0,01	Sem 48 (23.11.2015 - 29.11.2016)	Sem 48 (23.11.2015 - 29.11.2016)	0,02	0,0007	175
15-02-16	RTTX	16.01.2016 - 30.01.2016	0,002/ 0,02/ 0,23	Sem 1 (4.01.16 - 10.01.16)	Sem 4 (25.01.16 - 31.01.16)	0,11	0,11	12.379
16-02-16	ASKR	Julio 2015 - Enero 2016	0,02/ 0,2/ 1,08	Sem 4 (25.01.16 - 31.01.16)	Sem 8 (22.02.16 - 28.02.16)	0,64	0,38	21.511
23-02-16	HYBS	15.01.2016 - 02.02.2016	0,8/ 0,12/ 1,36	Sem 2 (11.01.16 - 17.01.16)	Sem 6 (8.02.16 - 14.02.16)	0,8	0	14.348
25-04-16	QHPP	21.07.2014 - 20.08.2014	0,05/ 3/ 18,5 % acumulada al brote del año 2014	-	-	-	0	-

Continuación Tabla 7.

04-05-16	<b>FHON</b>	NA/signología continua pero en baja cantidad diaria	0,02/ NA/ 1,22 acumulada al brote	Sem 17 (25.04.16 - 1.05.16)	Sem 19 (9.05.16 - 15.05.16)	0,7	0,7	13.630
04-05-16	<b>PMLC</b>	05.04.16 - 11.04.16	0,12 (promedio)/ 0,3 (semana muestreo)/ 3,02 acumulada al brote	Sem 14 (4.04.16 - 10.04.2016)	Sem 21 (23.05.16 - 29.05.16)	0,58	0,12	30.496
20-05-16	<b>SLND</b>			Sem 9 (29.02.16 - 6.03.16)	Sem 26 (27.06.16 - 3.07.16)	3,96	0,5	250.912
25-05-16	<b>PPVD</b>	01.05.16 - aún no termina	0,19 (24.05.16)/ 1,97 (18-24.05.16)/ 8,35 acumulada hasta el muestreo	Sem 18 (2.05.16 - 8.05.16)	Sem 26 (27.06.16 - 3.07.16)	3,94	1,56	62.159
10-06-16	<b>IFGF</b>	22.05.2016 - Continua en brote	0,33/ 6,23/ 8,7	Sem 9 (29.02.16 - 6.04.16)	Sem 26 (27.06.16 - 3.07.16)	3,96	3,96	250.912
13-06-16	<b>IPFA</b>	Centro no ha presentado brote	-	Sem 7 (15.02.16 - 21.02.16)	Sem 12 (21.03.16 - 27.03.16)	0,34	0	34.030
07-07-16	<b>JGHL</b>	09.05.16 - No hay hallazgos	0,5/ - / 61,7	Sem 16 (18.04.16 - 24.04.16)	Sem 20 (16.05.16 - 22.05.16)	0,26	0	20.864
12-07-16	<b>PRBE</b>	12.06.16 (alevines) y 21.06.16 (smolts grupo afectado) - Se mantiene mortalidad	Ver anexos	Sem 24 (13.06.16 - 19.06.2016)	Sem 30 (25.07.16 al 31.07.2016)	0,28	0,11	25.009
25-07-16	<b>IPFA(2º)</b>	30.06.16 - A la baja	- / 1,53 / 2,98	Sem 28 (11.07.16 - 17.07.16)	Sem 33 (15.08.16 al 21.08.16)	1,91	1,14	42.576
08-08-16	<b>ANEP</b>	26.05.16 -	0,4 / 3,3 / 8,07	Sem 21 (23.05.16 - 29.05.16)	Sem 29 (18.07.16 - 24.07.16)	0,12	0,01	4.030

Continuación Tabla 7.

23-08-16	<b>PERA</b>	18.07.16 - a la fecha	0,39 (21.08.16)/ 2,97 (15-21.08.16)/ 13,86 (18.07-21.08)	Sem 30 (25.07.16 - 31.07.16)	Sem 35 (29.08.16 - 4.09.16)	1,03	1,02	135.067
12-09-16	<b>PLNO</b>	08.08.16 (primeros hallazgos de necropsia) - aún se observa mortalidad asociada a esta enfermedad	- / 0,0035 (semana 32: 26 peces clasificados como mortalidad por IPNV)/ -	Sem 32 (8.08.16 - 14.08.16)	Sem 37 (12.09.16 - 18.09.16)	0,19	0,02	480
10-10-16	<b>CKBG</b>	15.08.16 -	0,02 / 0,2 / 3,93	-	-	-	0	-
25-10-16	<b>TAMB</b>	29.09.16 - En brote	Adjunto / adjunto / 7,9	Sem 39 (26.09.16 - 2.10.16)	Sem 45 (7.11.16 - 13.11.16)	3,61	3,6	97.891
07-11-16	<b>EKLT</b>	30.08.16 - sigue existiendo mortalidad por IPNV	0,01 / 0,03 / 0,9	Sem 35 (29.08.16 - 4.09.16)	Sem 38 (19.09.16 - 25.09.16)	0,07	0,004	693
08-11-16	<b>CMOO</b>	Sin brote	- / 0,001 / 0,001	-	-	-	0	-
09-11-16	<b>IGHF</b>	24.10.16 - aún reporta mortalidad asociada	0,08 / 0,5 / 3,02	Sem 43 (24.10.16 - 30.10.16)	Sem 47 (21.11.16 - 27.11.16)	1,45	0,05	2.910
23-11-16	<b>RPCO</b>	13.11.16 - En curso (a la baja)	0,017/ 0,152/ 0,318	Sem 47 (21.11.16 - 27.11.16)	Sem 48 (28.11.16 - 4.12.16)	0,14	0,06	7.855

## Resultados Diagnóstico y Cepario

Se analizaron 53 muestras de tejidos de peces, mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFAT), dos técnicas de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) y un PCR anidado (nested PCR), para determinar la presencia del virus IPN, además de realizar el aislamiento en cultivo celular de las cepas para su caracterización y construcción del cepario. En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos para estos análisis de diagnóstico, junto con el éxito en el aislamiento de los virus. Del total de muestras recibidas, la mayoría (39) resultó positiva para al menos una de las técnicas empleadas. Las técnicas de PCR en tiempo real (qRT-PCR VP1 y VP2) y PCR anidado, mostraron resultados similares a los obtenidos mediante IFAT, es decir, la mayoría de las muestras que resultaron positivas para IFAT también lo fueron para los ensayos de qRT-PCR, especialmente en el caso de muestras con valores de Ct bajos, i.e. con una alta cantidad de material genético del virus. La Figura 14 y 15, muestran los resultados de IFAT obtenidos por centro muestreado, demostrando la presencia de virus con capacidad infectiva en las muestras positivas para esta técnica, las cuales fueron en total 45 (ver Tabla 8). El título fue obtenido para 30 de las muestras, cabe destacar que éste ensayo tiene una duración de 18 a 20 horas post infección (hpi) y el IFAT 48 hpi como mínimo.

En general, los resultados muestran que casi todas las muestras recibidas provenían de peces infectados con el virus IPN, ya sea de forma aguda; ejemplificado en muestras que resultaron ser positivas para todos los análisis (i.e. SFAA, ASKR, FHON, SLND, PPVD, IFGF, PRBE, IPFA, PERA, TAMB, RPCO), o de forma crónica (infectados persistentemente), observado en muestras negativas para los análisis de qRT-PCR (i.e., SFJL, RTTX, PLNO, EKLT) o con valores de Ct muy altos, i.e. con baja cantidad de material genético de IPNV (i.e., IPFA, JGHL, CKBG, CMOO).

Con respecto al aislamiento en cultivo celular, este fue logrado en 50 de las 53 muestras (ver Tabla 7). Por lo que se logró aislar virus de a lo menos una muestra de todos los centros muestreados. Los virus aislados pasaron a formar parte del cepario, toda la información obtenida para éstos se encuentra contenida en la Tabla 9. Se realizaron mínimo 2 pases para todos los aislados y hasta 3 pases en algunos casos (i.e., IFGF, IPFA, JGHL, PRBE), para así comprobar que éstos siguieran activos.

Tabla 8. Resumen resultados de diagnóstico de muestras IPNV.

Muestras			Resultados					
Fecha Muestreo	Código	Nº Pool	qRT-PCR VP1 (Ct)	qRT-PCR VP2 (Ct)	PCR Anidado	IFAT	Título muestra (CF/ml)	Aislamiento CHSE-214
20-08-15	CHMD1	1	29,74	-	+	-	-	-
	CHMD2	2	22,22	29,56	+	+	-	+
20-08-15	SFAA1	1	20,69	28,40	+	+	2,2 x 10 <sup>5</sup>	+
	SFAA2	2	18,44	26,24	+	+	6,2 x 10 <sup>4</sup>	+
04-02-16	GMTS1	1	-	32,14	+	-	-	-
	GMTS2	2	22,94	24,65	+	+	1,1 x 10 <sup>5</sup>	+
10-02-16	SFJL1	1	-	-	+	-	-	-
	SFJL2	2	-	-	+	-	-	+
15-02-16	RTTX1	1	-	-	+	-	-	+
	RTTX2	2	-	-	+	-	-	+
16-02-16	ASKR1	1	26,72	27,36	+	+	4 x 10 <sup>2</sup>	+
	ASKR2	2	24,82	24,92	+	+	1,7 x 10 <sup>3</sup>	+
23-02-16	HYBS1	1	27,33	29,84	+	+	-	+
	HYBS2	2	27,28	30,54	+	-	-	+
25-04-16	QHPP1	1	24,37	27,45	+	+	-	+
	QHPP2	2	28,56	30,91	+	+	-	+
04-05-16	FHON1	1	25,66	22,78	+	+	2,4 x 10 <sup>6</sup>	+
	FHON2	2	26,46	22,58	+	+	2,3 x 10 <sup>6</sup>	+
04-05-16	PMLC1	1	26,70	27,66	+	+	-	+
	PMLC2	2	28,76	29,29	+	+	-	+
	PMLC3	3	26,30	27,27	+	+	2,6 x 10 <sup>2</sup>	+
20-05-16	SLND1	1	25,97	25,74	+	+	2,6 x 10 <sup>3</sup>	+
	SLND2	2	23,58	23,02	+	+	5,4 x 10 <sup>3</sup>	+
25-05-16	PPVD1	1	20,77	25,96	+	+	2,3 x 10 <sup>5</sup>	+
	PPVD2	2	17,99	22,58	+	+	9,9 x 10 <sup>5</sup>	+
10-06-16	IFGF1	1	25,34	28,59	+	+	2 x 10 <sup>2</sup>	+
	IFGF2	2	23,01	25,99	+	+	1,4 x 10 <sup>3</sup>	+
13-06-16	IPFA1	1	31,16	-	+	+	-	+
	IPFA2	2	-	-	+	+	-	+
07-07-16	JGHL1	1	-	-	+	+	-	+
	JGHL2	2	29,57	29,35	+	+	2,4 x 10 <sup>3</sup>	+
12-07-16	PRBE1	1	25,53	25,49	+	+	9,5 x 10 <sup>5</sup>	+
	PRBE2	2	24,77	25,32	+	+	5 x 10 <sup>5</sup>	+

Continuación Tabla 8.

25-07-16	IPFA3	3	26,04	27,03	+	+	$1 \times 10^5$	+
	IPFA4	4	26,27	27,26	+	+	$3,5 \times 10^5$	+
08-08-16	ANEP1	1	-	-	-	+	-	+
	ANEP2	2	24,31	28,86	+	+	$3 \times 10^5$	+
23-08-16	PERA1	1	23,03	25,66	+	+	$9,4 \times 10^3$	+
	PERA2	2	21,84	22,49	+	+	$2 \times 10^4$	+
12-09-16	PLNO1	1	-	-	+	+	$5,7 \times 10^3$	+
	PLNO2	2	31,62	-	+	+	$1,3 \times 10^4$	+
10-10-16	CKBG1	1	29,79	29,56	+	+	$2 \times 10^3$	+
	CKBG2	2	31,47	-	+	+	$1 \times 10^6$	+
25-10-16	TAMB1	1	18,14	20,26	+	+	$1,8 \times 10^4$	+
	TAMB2	2	19,02	20,99	+	+	$7,7 \times 10^3$	+
07-11-16	EKLT1	1	-	-	-	+	-	+
	EKLT2	2	-	-	-	-	-	+
08-11-16	CMOO1	1	31,64	31,28	+	+	-	+
	CMOO2	2	28,72	29,03	+	+	-	+
09-11-16	IGHF1	1	24,51	24,84	+	+	-	+
	IGHF2	2	24,73	24,92	+	+	-	+
23-11-16	RPCO1	1	18,41	19,16	+	+	$8,5 \times 10^2$	+
	RPCO2	2	17,68	18,32	+	+	$9 \times 10^2$	+
Total positivos para cada técnica			43	39	50	45	30	50

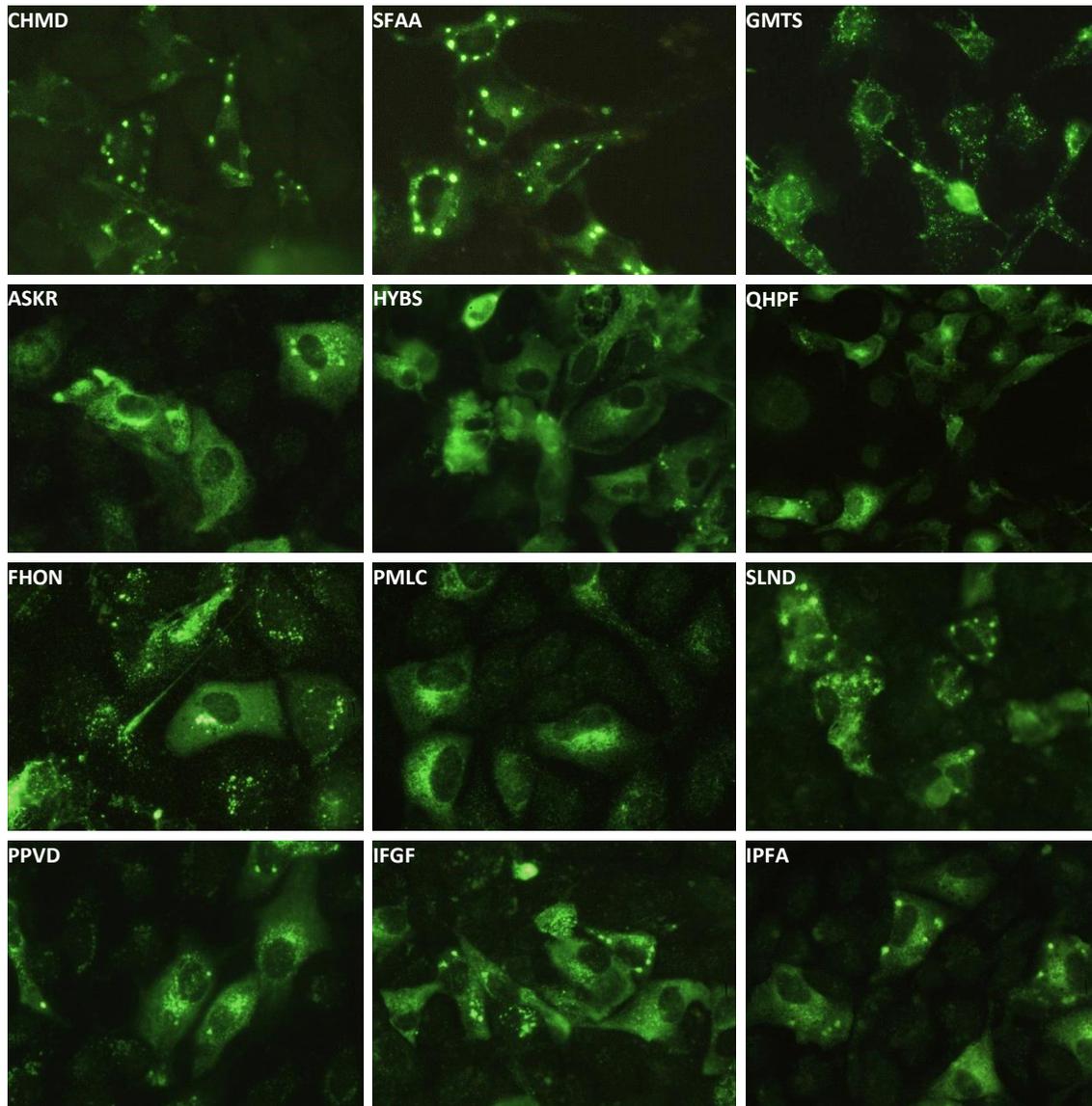


Figura 14. Resultados inmunofluorescencia indirecta (IFAT) de IPNV, para cada uno de los muestreos, indicados con el código de muestreo en cada foto. Se muestra un ejemplo por centro de células CHSE-214 infectadas con el virus: la fluorescencia indica el marcaje de la proteína VP2 con FITC (aumento 400X).

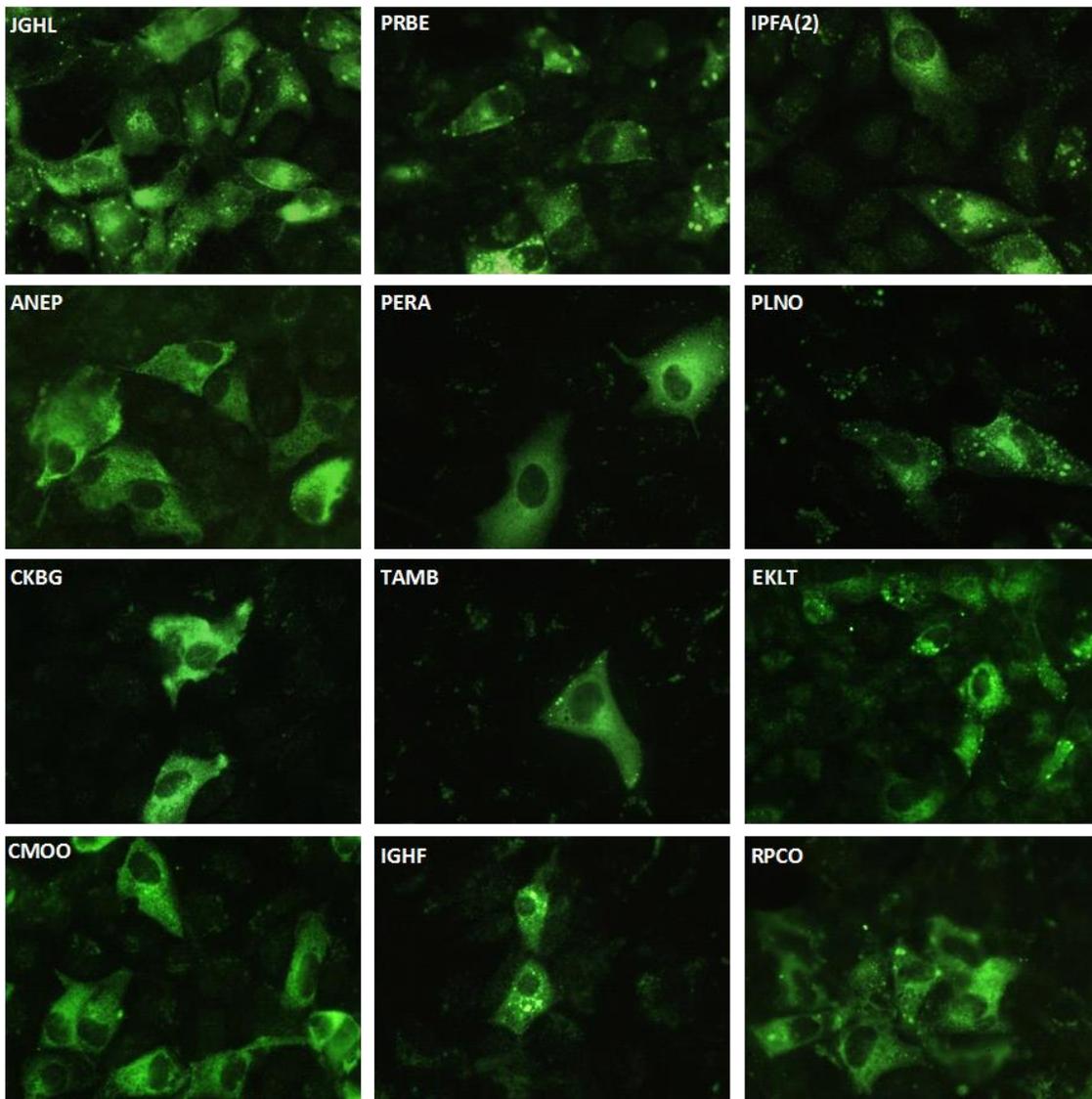


Figura 15. Resultados inmunofluorescencia indirecta (IFAT) de IPNV, para cada uno de los muestreos, indicados con el código de muestreo en cada foto. Se muestra un ejemplo por centro de células CHSE-214 infectadas con el virus: la fluorescencia indica el marcaje de la proteína VP2 con FITC (aumento 400X).

Tabla 9. Cepario aislados virus IPN conteniendo la información básica para cada uno de los virus aislados.

Código	Fecha Muestreo	Origen	Especie	Estado	Pases	Título (FF/ml)	Sec parcial seg A (523 bp)	Sec parcial seg A (1180 bp)	Sec Completa	Genogrupo	Ubicación ID Caja (posición)
CHMD2	20-08-2015	Bahía Nauto Isla Traiguen , Aysen	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2 pases	4,4 x 10 <sup>5</sup>	Si	Si	Si	5	AAV-07 (510-514)
SFAA1	20-08-2015	Rada Potreros de Cholgo, Los Lagos	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	1,7 x 10 <sup>4</sup>	Si	Si	-	5	AAV-07 (515-519)
SFAA2			<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	6,9 x 10 <sup>4</sup>	Si	Si	Si	5	AAV-07 (520-524)
GMTS2	04-02-2016	Entre Punta Claro y Puyehue, Isla del Rey	<i>O. kisutch</i>	Smolt	2 pases	1,4 x 10 <sup>4</sup>	Si	Si	Si	1	AAV-07 (525-529)
SFJL2	10-02-2016	Estuario Reloncavi, Chaparano	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	-	Si	-	Si	5	AAV-07 (530-534)
RTTX1	15-02-2016	Península, Lago Rupango	<i>O. kisutch</i>	Smolt	2 pases	-	-	Si	-	-	AAV-08 (535-537)
RTTX2			<i>O. kisutch</i>	Smolt	2 pases	-	Si	Si	Si	1	AAV-08 (538-547)
ASKR1	16-02-2016	Punta Tique, Chayahue	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	6,7 x 10 <sup>3</sup>	Si	Si	Si	5	AAV-08 (548-557)
ASKR2			<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	1,7 x 10 <sup>2</sup>	Si	Si	-	5	AAV-08 (558-567)
HYBS1	23-02-2016	Lago Llanquihue, Bahia Fonk	<i>O. kisutch</i>	Smolt	2 pases	5,8 x 10 <sup>6</sup>	Si	Si	Si	1	AAV-08 (568-573)
HYBS2			<i>O. kisutch</i>	Smolt	2 pases	6 x 10 <sup>4</sup>	Si	Si	-	1	AAV-08 (574-579)
QHPF1	25-04-2016	Rauco, Estero Castro	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	8,6 x 10 <sup>4</sup>	Si	Si	Si	5	AAV-08 (580-586)
QHPF2			<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	1,4 x 10 <sup>5</sup>	Si	Si	-	5	AAV-08 (587-594)
FHON1	04-05-2016	Punta Concha Blanca, Huelmo	<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	5	AAV-08 (595-600)
FHON2			<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	Si	5	AAV-08 (600-606)
PMLC1	04-05-2016	Molco Alto	<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	5	AAV-08 (607-611)
PMLC2			<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	5	AAV-08 (612-617)
PMLC3			<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	Si	5	AAV-08 (618-622)
SLND1	20-05-2016	Punta Tique, Chayahue	<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si		5	AAV-08 (623-628)
SLND2			<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	Si	5	AAV-08 (628-634)
PPVD1	25-05-2016	Pullinque	<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si		5	AAV-09 (635-640)
PPVD2			<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	Si	5	AAV-09 (641-646)
IFGF1	10-06-2016	Punta Tique, Chayahue	<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	5	AAV-09 (647-651)
IFGF2			<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	5	AAV-09 (651-656)
IPFA1	13-06-2016	Rodado Notable del Fiordo Aysen	<i>Salmo salar</i>	Alevín	3 pases	4,5 x 10 <sup>1</sup>	Si	Si	-	5	AAV-09 (657-663; 708-710)
IPFA2			<i>Salmo salar</i>	Alevín	3 pases	2,2 x 10 <sup>4</sup>	Si	Si	Si	5	AAV-09 (664-671; 711-713)
JGHL1	07-07-2016	Río Pichichanleufu	<i>Salmo salar</i>	Alevín	3 pases	3,2 x 10 <sup>3</sup>	Si	Si	Si	5	AAV-09 (672-680)
JGHL2			<i>Salmo salar</i>	Alevín	3 pases	1,8 x 10 <sup>3</sup>	Si	Si	-	5	AAV-09 (681-689)

Continuación Tabla 9.

PRBE1	12-07-2016	Fundo Los Chilcos	<i>Salmo salar</i>	Smolt	3 pases	$1,9 \times 10^2$	Si	Si	Si	5	AAV-09 (690-698)
PRBE2			<i>Salmo salar</i>	Smolt	3 pases	$8,9 \times 10^2$	Si	Si	-	5	AAV-09 (699-707)
IPFA3	25-07-2016	Rodado Notable del Fiordo Aysen	<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	$2 \times 10^3$	Si	Si	-	5	AAV-09 (714-723)
IPFA4			<i>Salmo salar</i>	Alevín	2 pases	$5,4 \times 10^5$	Si	Si	-	5	AAV-09 (724-733)
ANEP1	08-08-2016	Sur Punta Queilen, Canal Queilen	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2 pases	-	-	Si	-	5	AAV-10 (734-742)
ANEP2			<i>Salmo salar</i>	Adulto	2 pases	-	Si	-	-	5	AAV-10 (743-750)
PERA1	23-08-2016	El Peral, sector Santa Laura	<i>O. mykiss</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	1	AAV-10 (751-757)
PERA2			<i>O. mykiss</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	1	AAV-10 (758-764)
PLNO1	12-09-2016	Seno Skyring, Norte de Punta Laura	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2 pases	-	Si	Si	-	5	AAV-10 (765-772)
PLNO2			<i>Salmo salar</i>	Adulto	2 pases	$2,7 \times 10^5$	Si	Si	-	5	AAV-10 (773-780)
CKBG1	10-10-2016	Norte Canal Goñi, Isla James	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	$1,1 \times 10^6$	Si	Si	-	5	AAV-10 (781-788)
CKBG2			<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	$1,6 \times 10^4$	Si	Si	-	5	AAV-10 (788-796)
TAMB1	25-10-2016	Río Bueno	<i>O. mykiss</i>	Alevín	2 pases	$6,3 \times 10^4$	Si	Si	-	1	AAV-10 (797-804)
TAMB2			<i>O. mykiss</i>	Alevín	2 pases	-	Si	Si	-	1	AAV-10 (805-812)
EKLT1	07-11-2016	Noroeste Isla Aullín	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	$5,3 \times 10^3$	-	Si	-	5	AAV-10 (813-821)
EKLT2			<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	$2,6 \times 10^3$	-	-	-	-	AAV-10 (822-830)
CMOO1	08-11-2016	Norte Canal Goñi, Isla James	<i>Salmo salar</i>	Adulto	2 pases	$6,6 \times 10^5$	Si	-	-	5	AAV-11 (831-839)
CMOO2			<i>Salmo salar</i>	Adulto	2 pases	$2,2 \times 10^3$	Si	Si	-	5	AAV-11 (840-848)
IGHF1	09-11-2016	Noroeste Punta Victoria, Isla Churrecue	<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	$1,4 \times 10^2$	Si	Si	-	5	AAV-11 (849-855)
IGHF2			<i>Salmo salar</i>	Smolt	2 pases	-	Si	Si	-	5	AAV-11 (856-862)
RPCO1	23-11-2016	Lago Rupanco	<i>O. mykiss</i>	Smolt	2 pases	$7,7 \times 10^5$	Si	Si	-	1	AAV-11 (863-870)
RPCO2			<i>O. mykiss</i>	Smolt	2 pases	$1,6 \times 10^6$	Si	Si	-	1	AAV-11 (871-878)

## Signología Clínica

En base a la información de hallazgos clínicos recopilada de las fichas de muestreo, junto con la signología clínica identificada en las fotos de la necropsia se contruyó la Tabla 10. En esta se señalan los signos clínicos que se consideran propios de la enfermedad de IPN, de acuerdo a la bibliografía (Tabla 3). En las Figuras 16, 17 y 18 se presentan fotos de las necropsias de cada centro muestreado, con el fin de mostrar y confirmar los signos clínicos reportados en las fichas de muestreo.

En la Tabla 10 se observa que las muestras provenientes de los centros caso analizados en este estudio exhibieron un total de 22 signos clínicos asociados a IPN. Los muestreos con código CHMD, PLNO, CKBG e IGHF manifestaron sobre el 50% de esta signología, sobre un 25% los peces con código SFAA, IFGF, GMTS, IPFA2°, ANEP, RPCO, ASKR, PPVD, TAMB y SFJL. Los restantes centros, vale decir, RTTX, PMLC, IPFA, JGHL, PRBE, FHON, HYBS, QHPF, CMOO y EKLT mostraron las frecuencias más bajas de signología clínica atribuible a IPN, incluso ningún signo como fue el caso de EKLT. Del total de 26 muestreos, se registraron los hallazgos clínicos en 24 centros, ya que en el caso de los centros con código SLND y PERA, los peces correspondieron a ejemplares menores a 4 cm, por lo que no se les efectuó necropsia y fueron enviados enteros al laboratorio.

Los muestreos que evidenciaron al menos 2 signos agudos de la enfermedad de IPN, vale decir, abultamiento abdominal, hígado pálido y/o amarillo, petequias en ciegos pilóricos, intestino con exudado catarral y edema blanco amarillo en el orificio anal, fueron ANEP, IFGF, ASKR, RPCO, IPFA2°, PPVD, PMLC, GMTS, IGFH, TAMB, CKBG, SFAA, CHMD y PLNO, siendo éste último el que presenta mayor frecuencia (Tabla 10 y Figuras 16, 17 y 18). Entre esta signología aguda de IPN, se destacan los muestreos CHMD, SFAA, GMTS, ASKR, IPFA2°, ANEP, PLNO, CKBG, TAMB, IGHF y RPCO ya que exhibieron líquido mucoso en el sistema digestivo, siendo éste uno de los signos más distintivos de la enfermedad de IPN (Tabla 10 y Figuras 16 y 18). Igualmente, la ascitis se manifiesta comúnmente en casos de esta enfermedad, la cual fue observada en GMTS, IFGF, PLNO, CKBG, TAMB, IGHF y SFAA, aunque en estos dos últimos de manera sanguinolenta (Tabla 10 y Figura 17). La ocurrencia de este hallazgo en los centros mencionados fue bajo, presentándose solo en a lo más 3 de los 10 peces muestreados. Para el caso del muestreo código PPVD, 8 de los 10 peces presentaban enteritis catarral, signo clínico normalmente

asociado a infección por IPNV (Tabla 10 y Figura 17). Los peces de los centros QHPF, EKLT y CMOO, no presentaron ningún signo atribuible a un cuadro agudo de IPN. Por otro lado, los peces de los centros SFJL, RTTX, HYBS, IPFA, PRBE y JGHL solo mostraron un signo agudo de la enfermedad, hígado pálido, en muy baja frecuencia de ocurrencia (Tabla 10).

Tabla 10. Signos clínicos asociados a IPNV encontrados en las muestras analizadas. Con una X se destaca la signología encontrada exclusivamente en las fotos de la necropsia. Ensombrecido se presenta la signología comúnmente asociada a un cuadro agudo por IPNV.

Órgano	Diagnóstico	CHMD	SFAA	GMTS	SFJL	RTTX	ASKR	HYBS	QHPF	FHON	PMLC	PPVD	IFGF	IPFA	JGHL	PRBE	IPFA2º	ANEP	PLNO	CKBG	TAMB	EKLT	CMOO	IGHF	RPCO
Piel	Oscurecimiento		5/10				2/10		3/10			X	3/10	1/10	2/10		14/53	1/10		2/10				1/10	4/10
	Petequias		1/10	X	1/10	1/10													5/10						
Branquias	Pálidas	4/10			6/10	2/10	2/10		2/10				5/10		X		29/53	3/10	2/10	3/10			2/10	2/10	3/10
Globo ocular	Exoftalmia	1/10			5/10		2/10						5/10	1/10			5/53	1/10	1/10		1/10				
Ano	Otros (Exudado amarillo)																								X
Hígado	Pálido	8/10	4/10	4/10	2/10	5/10	5/10	1/10		2/10	4/10	X	4/10	1/10	2/10	X	13/53	5/10	3/10	3/10	4/10			2/10	1/10
	Congestivo	X	2/10	X	2/10	X							5/10	1/10	X	X		X	2/10	3/10	X			3/10	X
	Color amarillo	1/10	4/10							6/10							15/53		5/10	2/10				4/10	1/10
Grasa visceral	Hemorrágica	7/10		3/10		4/10							2/10				2/53		6/10	1/10					
	Otros (Petequias)	X	X									X				X			X					1/10	
Intestino	Paredes hemorrágicas	3/10																							
	Enteritis catarral												8/10												
Ciegos pilóricos	Hemorrágicos	1/10	3/10	5/10												5/10					1/10				
	Petequias	X	6/10							7/10	2/10	3/10							5/10						
Bazo	Pálido	6/10											4/10							2/10				2/10	
Sistema digestivo	Mucosas hemorrágicas			3/10																					
	Con contenido líquido/mucoso	3/10		2/10		2/10											13/53	5/10	3/10	7/10	2/10			5/10	1/10
	Sin contenido	5/10	1/10		8/10	8/10	10/10		10/10	5/10		6/10	5/10				20/53	5/10	3/10	2/10			9/10	5/10	8/10
Cavidad abdominal	Ascitis			2/10									1/10						3/10	1/10	1/10				
	Sangre		1/10																					2/10	
Riñón	Pálido									4/10	2/10	2/10							2/10					2/10	
Corazón	Pálido	2/10				X									X			1/10	2/10	2/10				2/10	5/10

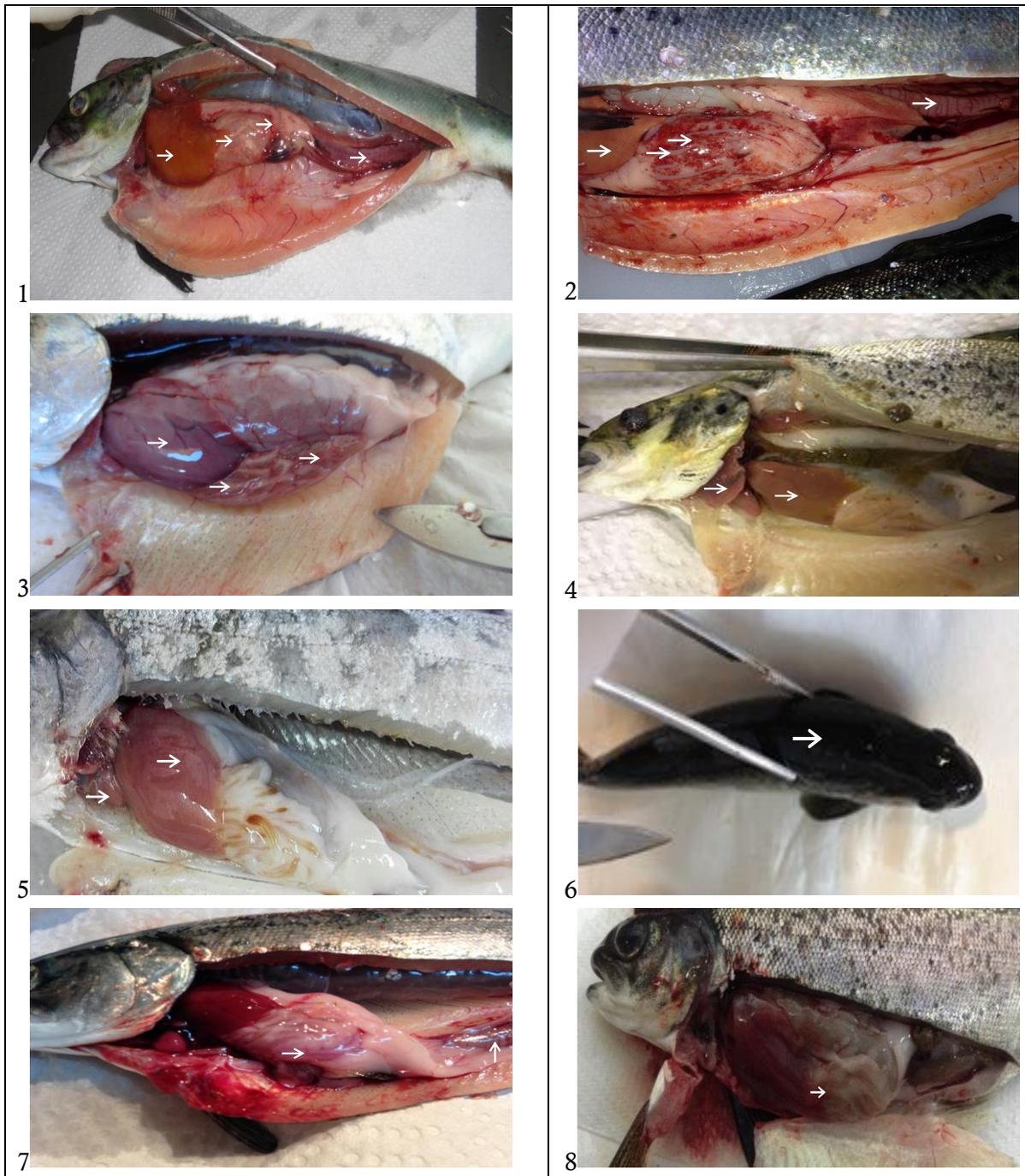


Figura 16. Signos clínicos asociados a las muestras en orden de aparición. 1) CHMD: • Hígado pálido; • Ciegos pilóricos congestivos; • Grasa visceral hemorrágica; • Intestino con paredes hemorrágicas. 2) SFAA: A • Hígado amarillo; • Ciegos pilóricos congestivos; • Grasa visceral con hemorragias petequiales; • Intestino con paredes congestivas 3) GMTS: • Hígado pálido y congestivo; • Ciegos pilóricos congestivos; • Grasa visceral congestiva. 4) SFJL: • Branquias pálidas; • Hígado pálido. 5) RTTX: • Corazón pálido; • Hígado pálido. 6) ASKR: • Oscurecimiento en piel. 7) HYBS: • Ciegos pilóricos congestivos; • Intestino con paredes congestivas. 8) QHPF: • Grasa visceral congestiva.



Figura 17. Signos clínicos asociados a las muestras en orden de aparición. 1) FHON: • Hígado pálido; • Grasa visceral congestiva. 2) PMLC: • Hígado amarillo con focos hemorrágicos; • Grasa visceral congestiva. 3) PPVD: • Hígado pálido; • Grasa visceral y ciegos pilóricos con petequias. 4) IFGF: • Hígado pálido; • Ascitis. 5) IPFA: • Hígado pálido. 6) JGHL: • Corazón pálido; • Hígado pálido; • Intestino con paredes congestivas. 7) PRBE: • Hígado pálido y congestivo; • Grasa visceral con petequias; • Ciegos pilóricos congestivo. 8) IPFA2°: • Hemorragias periculares.



Figura 18. Signos clínicos asociados a las muestras en orden de aparición. 1) ANEP: • Hígado pálido y congestivo; • Ciegos pilóricos congestivos; • Cavidad abdominal con adherencias; • Intestino con paredes congestivas. 2) PLNO: • Sistema digestivo con contenido líquido mucosa. 3) CKBG: • Hígado pálido y congestivo; • Grasa visceral congestiva; • Intestino con paredes congestivas. 4) TAMB: • Ano protruído y con exudado amarillo. 5) EKLT: • Cerebro congestivo. 6) CMOO: • Hígado con hepatomegalia; • Grasa visceral congestiva. 7) IGHF: • Hígado pálido con focos hemorrágicos y hepatomegalia; • Cavidad abdominal con sangre; • Ciegos pilóricos congestivos; • Grasa visceral congestiva; • Intestino con paredes congestivas. 8) RPCO: • Aletas hemorrágicas.

## **Histopatología**

El examen histopatológico, se realizó a los centros que mostraron una detección positiva del virus IPN. El resultado de estos análisis se resume en la Tabla 11, donde se consideraron solo los signos que son relevantes en un diagnóstico de IPN, de acuerdo a la bibliografía (Tabla 4) y los informes de análisis patológico del laboratorio Pathovet. De los 26 centros muestreados, se realizó el análisis histopatológico a 25, ya que los peces con código SLND fueron enviados desde el centro sin solución fijadora (formalina tamponada al 10%), por lo que su grado de descomposición no permitió posteriores análisis. En las Figuras 19, 20 y 21 se muestran fotografías de cortes histológicos de hígado, ciegos pilóricos y páncreas, provenientes de un pool de peces de cada centro positivo. Se destacan los signos más notorios atribuibles a una infección por IPNV, los cuales apuntan principalmente a lesiones necróticas y apoptóticas en páncreas exocrino, tejido adiposo peripancreático, parénquima hepático y mucosa cecal.

En la Tabla 11 se observa que la mayoría de los centros muestreados presentaron al menos un signo histopatológico asociado con un cuadro agudo de IPN (Figura 19), vale decir, lesiones necróticas y apoptóticas en páncreas exocrino, parénquima hepático y ciegos pilóricos, acompañado de exfoliación de células en el espacio intraluminal en este último. Los peces de los centros RTTX y QHPF fueron los únicos que no evidenciaron este tipo de signología. Los centros en los que se observó la mayoría de hallazgos relacionados con un cuadro agudo de IPN fueron los representados por los códigos CHMD, GMTS, ANEP, SFAA, IPFA2°, PLNO, CKBG y TAMB (Tabla 11).

Se observó en los peces muestreados con códigos CHMD, SFAA, ASKR, FHON, PMLC, PPVD, IFGF, JGHL, ANEP, PERA, TAMB y RPCO, una exfoliación celular en el lumen de los ciegos pilóricos (tiflitis necrotizante) característico de infección por virus IPN, el cual se asocia a restos de una destrucción celular (Tabla 11 y Figura 19-1 y 7).

Los peces muestreados con códigos RPCO, IFGF, PRBE, EKLTL, IGHF, PPVD, IPFA, JGHL, PERA y CMOO presentaron a lo menos 3 signos histopatológicos tales como atrofia de páncreas, tejido peripancreático, hepatocitos y mucosa cecal, indicios degenerativos ligados a secuelas por infección de IPN y asociados a un cuadro de carácter subagudo a crónico de la enfermedad (Tabla 11 y Figura 20).

En los peces con código SFJL (Figura 21-1) solo se observaron cambios inflamatorios inespecíficos o atrofia de hepatocitos, sin evidencias claras de un compromiso por un cuadro infeccioso por IPNV. Los peces con código QHPF (Figura 21-2) presentaron señales de haber cursado un proceso inflamatorio de tipo infeccioso, pero no existe un compromiso del estado general de los peces. En HYBS (Figura 21-3) los peces no mostraron indicios de un problema infeccioso, sino que solo se observó una disminución en la actividad funcional de los órganos por probable aporte deficiente de nutrientes.

Tabla 11. Signos histopatológicos asociados a IPNV identificados en las muestras analizadas de tejido de hígado, ciego y páncreas. El análisis se presenta en base a una muestra positiva proveniente de cada centro. Se destacan en rojo y gris los signos asociados a un cuadro agudo y un cuadro subagudo a crónico por IPNV, respectivamente.

Órgano	Diagnóstico	CHMD	SFAA	GMTS	SFJL	RTTX	ASKR	HYBS	QHPF	FHON	PMLC	PPVD	IFGF	IPFA	JGHL	PRBE	IPFA2º	ANEP	PERA	PLNO	CKBG	TAMB	EKLT	CMOO	IGHF	RPCO		
Hígado	Espacio portal	Hepatitis mononuclear																										
	Espacio perivascular	Hepatitis perivascular mixta																										
	Parénquima	Atrofia de hepatocitos	1/5	-	-	3/5	-	-	5/5	-	-	-	-	1/5	-	4/5	4/5	-	-	-	-	-	-	-	2/5	-	-	-
		Apoptosis de hepatocitos	-	-	4/5	1/5	-	2/5	-	-	5/5	5/5	5/5	1/5	3/5	2/5	2/5	3/5	2/5	-	3/5	-	4/5	-	-	-	-	-
		Necrosis en hepatocitos	3/5	4/5	2/5	1/5	-	5/5	-	-	5/5	3/5	2/5	4/5	1/5	-	4/5	1/5	1/5	1/5	-	2/5	-	-	1/5	1/5	3/5	-
		Autólisis	2/5	-	3/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/5	-	5/5	4/5	-	-	4/5	5/5	-	-
		Reacción inflamatoria mixta intersticial	-	1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Infiltrado inflamatorio mononuclear	-	-	-	-	-	-	-	2/5	5/5	2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tumefacción turbia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/5	4/5	3/5	-
		Ciegos	Autólisis de mucosa cecal	4/5	-	5/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5	5/5	-	2/5	2/5	5/5	-
Apoptosis epitelial en mucosa cecal	1/5		2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/5	3/5	-	-	4/5	-	-	-	1/5		
Atrofia de mucosa cecal	-		-	-	-	-	-	-	-	1/5	-	2/5	1/5	-	-	1/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/5		
Tiflitis eosinofílica	-		-	4/5	-	-	-	2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tiflitis necrotizante	1/5		3/5	-	-	-	5/5	-	-	1/5	2/5	1/5	3/5	-	1/5	-	-	4/5	3/5	-	-	4/5	-	-	-	2/5		
Hiperemia mucosa cecal	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/5	-	-	-	-	-	-	-	-	1/5	-		
Infiltrado de células mononucleares	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/5	-	-	-		
Páncreas	Atrofia de tejido adiposo peripancreático	3/5	2/5	-	-	-	4/5	4/5	-	-	-	-	3/5	1/5	4/5	1/5	2/5	4/5	5/5	-	1/5	-	4/5	4/5	3/5	4/5		
	Degeneración de tejido adiposo peripancreático	-	-	-	-	-	-	-	1/5	-	3/5	5/5	-	2/5	5/5	3/5	-	-	-	-	3/5	-	2/5	3/5	4/5	3/5		
	Hiperemia y/o hemorragia en tejido adiposo peripancreático	1/5	2/5	2/5	-	-	2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	3/5	1/5	2/5	-	2/5	2/5	1/5	-	3/5	4/5	-		
	Atrofia de páncreas exocrino	-	-	-	-	-	5/5	-	-	2/5	3/5	5/5	3/5	1/5	5/5	1/5	3/5	1/5	5/5	-	-	4/5	1/5	-	4/5	4/5		
	Pancreatitis mononuclear intersticial	-	-	-	-	-	5/5	-	1/5	-	1/5	-	2/5	-	3/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Apoptosis en páncreas exocrino	1/5	2/5	2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/5	3/5	-	3/5	1/5	4/5	-	-	-		
	Necrosis en páncreas exocrino	4/5	5/5	4/5	-	-	-	-	-	-	-	5/5	3/5	-	-	3/5	1/5	3/5	-	1/5	1/5	4/5	-	3/5	-	2/5		
	Reacción inflamatoria mixta intersticial	-	-	4/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/5	2/5	1/5	-	-	1/5	-	-	2/5		
Fibrosis intersticial	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/5	-	-	1/5			

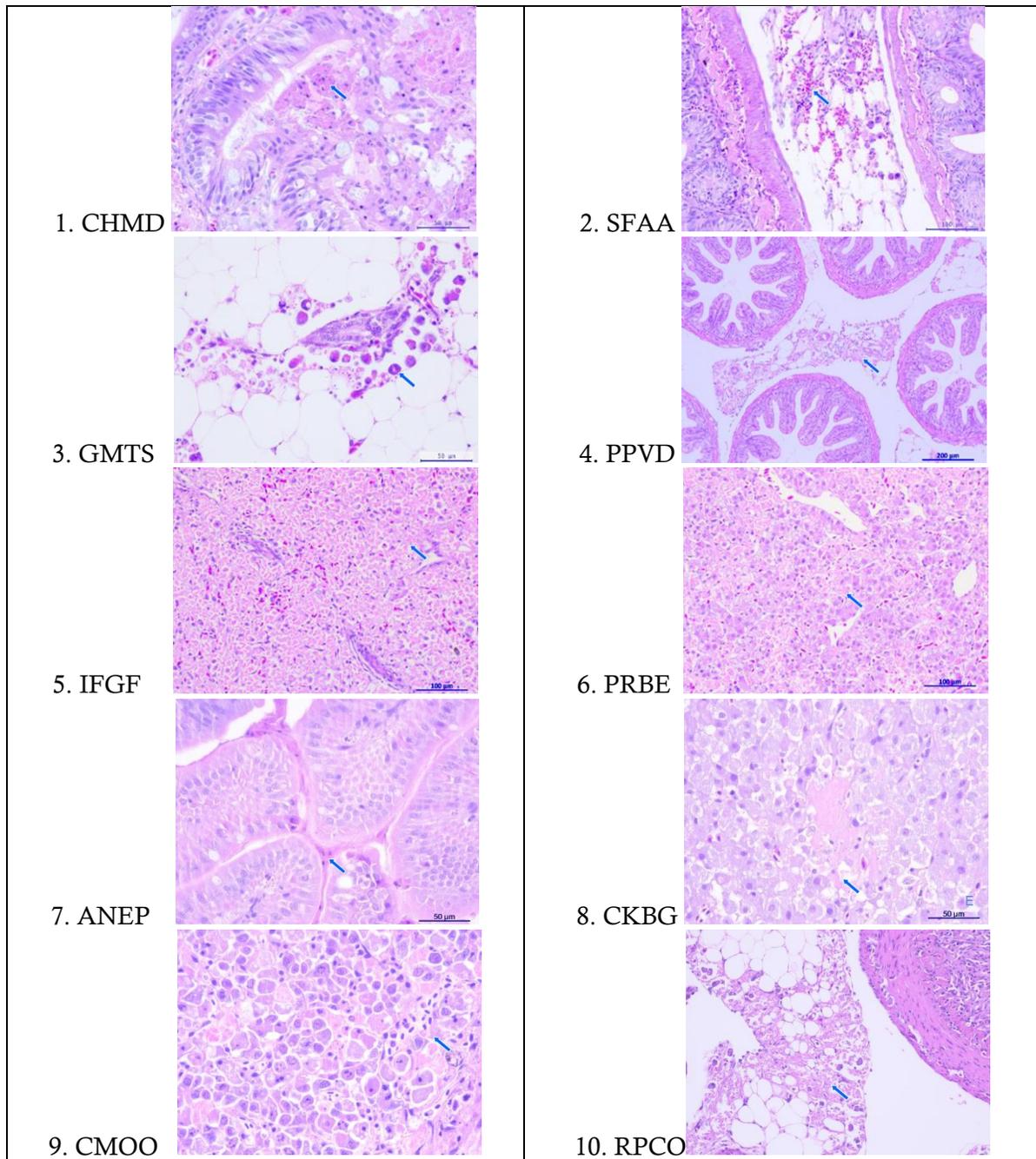


Figura 19. Signos histopatológicos asociados a signología aguda en las muestras (↑). Tinción con hematoxilina-eosina. 1) Detritus celular intraluminal en ciegos pilóricos; 2) Necrosis y hemorragia focal en páncreas exocrino; 3) Necrosis severa en páncreas exocrino y apoptosis celular; 4) Necrosis de coagulación difusa en páncreas exocrino con atrofia de tejido adiposo; 5) Necrosis de coagulación difusa en hepatocitos; 6) Degeneración microvacuolar y necrosis de coagulación en hepatocitos; 7) Necrosis y exfoliación epitelial en ciegos pilóricos; 8) Necrosis focal en parénquima hepático; 9) Autólisis leve, con hepatocitos en los cuales es posible observar necrosis de células aisladas; 10) Necrosis de coagulación en tejido de páncreas exocrino.

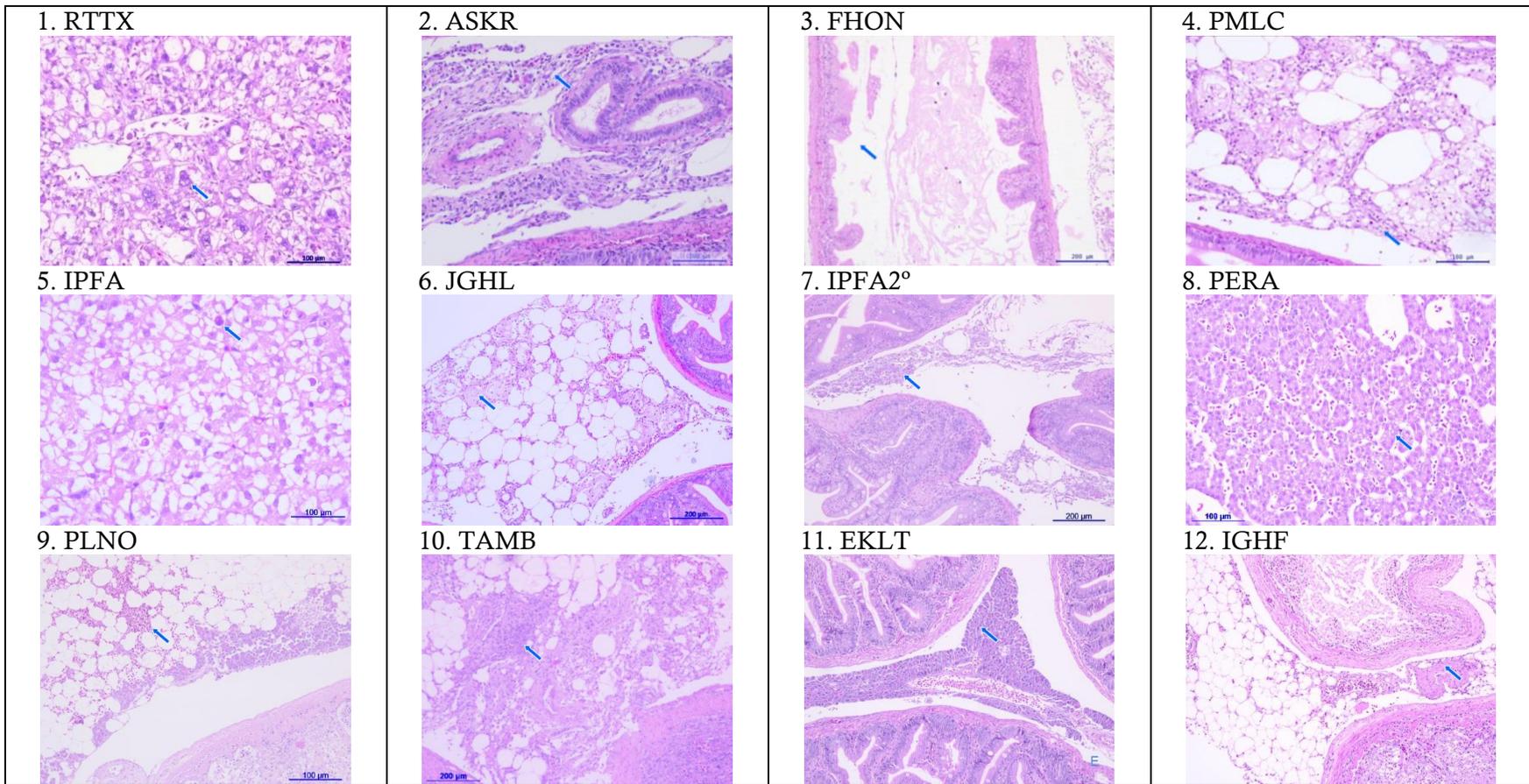


Figura 20. Signos histopatológicos asociados a signología subaguda a crónica en las muestras (↑). Tinción con hematoxilina-eosina. 1) Macronúcleos en hepatocitos con degeneración vacuolar; 2) Atrofia severa de páncreas exocrino con inflamación mononuclear intersticial; 3) Atrofia de vellosidades cecales; 4) Degeneración de tejido adiposo con atrofia de páncreas exocrino; 5) Degeneración vacuolar en citoplasma y apoptosis de hepatocitos; 6) Atrofia difusa en páncreas exocrino y degeneración de tejido adiposo; 7) Atrofia de páncreas exocrino y de tejido adiposo; 8) Atrofia y degeneración vacuolar en hepatocitos; 9) Hemorragia intersticial focal en tejido adiposo; 10) Atrofia y fibrosis en páncreas exocrino; 11) Atrofia de tejido adiposo; 12) Atrofia difusa de páncreas exócrino.

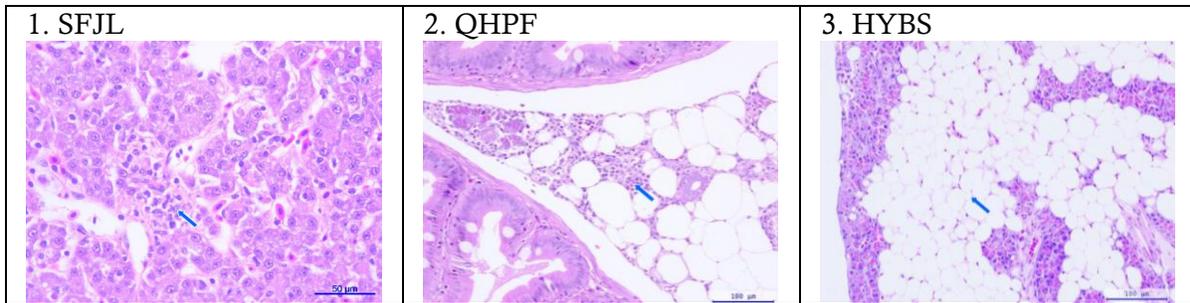


Figura 21. Signos histopatológicos inespecíficos asociados a las muestras (↑). Tinción con hematoxilina-eosina. 1) Infiltrado inflamatorio mixto en espacio perivascular; 2) Infiltrado inflamatorio mononuclear focal en parénquima; 3) Infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial focal en páncreas exocrino.

### Secuenciación y Análisis Bioinformático

La secuenciación se realizó tanto a partir del material genético amplificado extraído directamente del tejido homogeneizado de los peces, como del ARN viral proveniente de los aislados en cultivo celular. Como ambas amplificaciones resultaron casi idénticas, según lo reportado en el informe n°2, aquí se muestran las secuencias de los homogeneizados mediante PCR anidado (fragmento de 523 pb) con la excepción de RTTX para él cual se utilizó la secuencia del aislado y de los aislados (fragmento de 1180 pb). Además se lograron secuenciar 15 aislados completos, i.e., el segmento A y B del virus, cuyos códigos son: CHMD, SFAA, GMTS, SFJL, RTTX, ASKR, HYBS, QHPPF, FHON, PMLC, SLND, PPVD, IPFA, JGHL y PRBE (Tabla 12). En la Tabla 12 se presenta un resumen de todas las secuencias realizadas. Se puede observar que con el PCR anidado, se secuenció con éxito al menos una muestra de cada centro, salvo las muestras código EKL.T. La secuenciación y análisis molecular de los virus indicó que la mayoría de los IPNV identificados corresponden al genogrupo 5 (40), y en menor medida al genogrupo 1 (12). Además, la Tabla 12 muestra un resumen de los genogrupos resultantes para cada muestreo realizado, asociándolo a la especie de la que provienen los virus secuenciados. Todos los virus pertenecientes al Genogrupo 5 fueron detectados en *Salmo salar* (20 centros) y los del Genogrupo 1 en *Oncorhynchus* spp. (6 centros).

Tabla 12.. Resumen secuenciación muestras. ND=No disponible.

1	Fecha muestreo	Código centro	Muestra	Especie	1180 pb	523 pb	Segmentos completos		Genogrupo
							Seg. A	Seg. B	
1	20-08-2015	CHMD	CHMD1 CHMD2	<i>Salmo salar</i>	- +	+ +	ND +	ND +	5
2	20-08-2015	SFAA	SFAA1 SFAA2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND +	ND +	5
3	04-02-2016	GMTS	GMTS1 GMTS2	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	- +	+ +	ND +	ND +	1
4	10-02-2016	SFJL	SFJL1 SFJL2	<i>Salmo salar</i>	- +	+ +	ND +	ND +	5
5	15-02-2016	RTTX	RTTX1 RTTX2	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	+ +	+ +	ND +	ND +	1
6	16-02-2016	ASKR	ASKR1 ASKR2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	+ ND	+ ND	5
7	23-02-2016	HYBS	HYBS1 HYBS2	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	+ +	+ +	+ ND	+ ND	1
8	25-04-2016	QHPF	QHPF1 QHPF2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	+ ND	+ ND	5
9	04-05-2016	FHON	FHON1 FHON2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND +	ND +	5
10	04-05-2016	PMLC	PMLC1 PMLC2 PMLC3	<i>Salmo salar</i>	+ + +	+ + +	ND ND +	ND ND +	5
11	20-05-2016	SLND	SLND1 SLND2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND +	ND +	5
12	25-05-2016	PPVD	PPVD1 PPVD2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND +	ND +	5
13	10-06-2016	IFGF	IFGF1 IFGF2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	5
14	13-06-2016	IPFA	IPFA1 IPFA2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND +	ND +	5
15	07-07-2016	JGHL	JGHL1 JGHL2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	+ ND	+ ND	5
16	12-07-2016	PRBE	PRBE1 PRBE2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	+ ND	+ ND	5
17	25-07-2016	IPFA2°	IPFA3 IPFA4	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	5
18	08-08-2016	ANEP	ANEP1 ANEP2	<i>Salmo salar</i>	+ -	- +	ND ND	ND ND	5
19	23-08-2016	PERA	PERA1 PERA2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	1
20	12-09-2016	PLNO	PLNO1 PLNO2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	5
21	10-10-2016	CKBG	CKBG1 CKBG2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	5
22	25-10-2016	TAMB	TAMB1 TAMB2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	1
23	07-11-2016	EKLT	EKLT1 EKLT2	<i>Salmo salar</i>	+ -	- -	ND ND	ND ND	5
24	08-11-2016	CMOO	CMOO1 CMOO2	<i>Salmo salar</i>	- +	+ +	ND ND	ND ND	5
25	09-11-2016	IGHF	IGHF1 IGHF2	<i>Salmo salar</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	5
26	23-11-2016	RPCO	RPCO1 RPCO2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	+ +	+ +	ND ND	ND ND	1

En la Figura 22 se muestra el árbol filogenético para las secuencias obtenidas mediante la amplificación por PCR anidado de los tejidos homogeneizados, con la excepción de RTTX cuyas muestras mostraron bandas en el análisis de los geles, sin embargo, no se logró una buena calidad para las secuencias. En el árbol, se muestra solo la representación de una de las secuencias de las dos o tres muestras obtenidas por cada centro muestreado. Se presentan además los 8 genogrupos reconocidos de virus IPN en el mundo representados por aislados de referencia para cada uno. Claramente se observa que las secuencias de los virus analizados se clasifican en el Genogrupo 1 y Genogrupo 5, con mayor frecuencia de representatividad en este último. Los virus identificados con código, GMTS, RTTX, HYBS, PERA, TAMB y RPCO pertenecen al Genogrupo 1, mientras que CHMD, SFAA, SFJL, ASKR, QHPF, FHON, PMLC, SLND, PPVD, IFGF, IPFA, JGHL, PRBE, IPFA2°, ANEP, PLNO, CKGB, CMOO e IGHF se clasifican en el Genogrupo 5. Las muestras de virus código EKLTL fueron las únicas que no fue posible secuenciar a través de esta metodología. En el Genogrupo 1 se observa que las secuencias encontradas en este trabajo forman un subgrupo junto con otros aislados chilenos, separándose de los aislados de referencia (e.g., DM, WB y VR299). En el Genogrupo 5 no se observa esta separación con las cepas de referencia europeas.

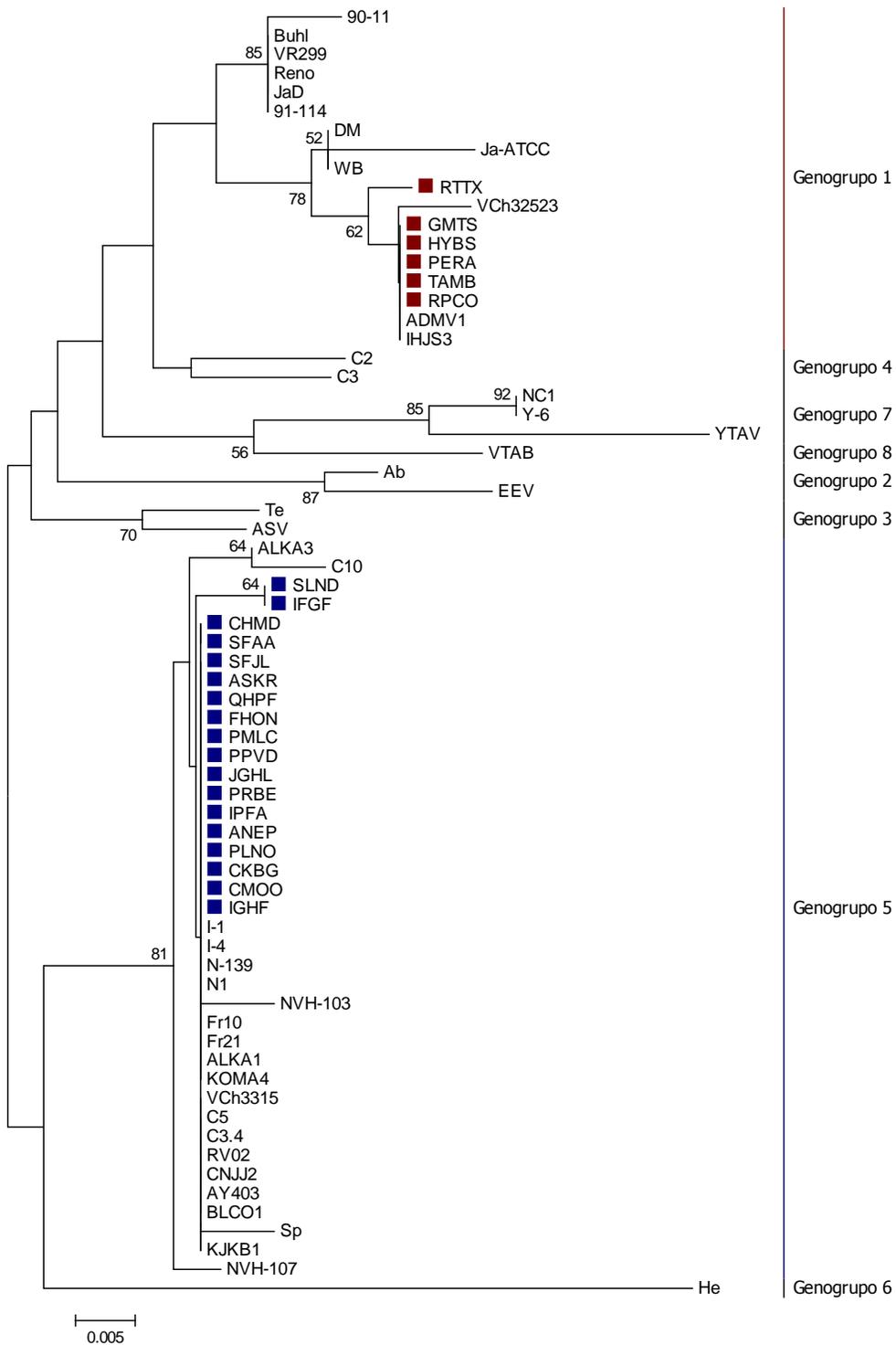


Figura 22. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias de 523 pb analizadas en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificadas con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente.

En la Figura 23 se muestra el árbol filogenético construido con los virus IPN aislados, estas secuencias provienen del segmento A de la proteína VP2 y tienen un largo aproximado de 1180 pb. Se puede observar que las secuencias se distribuyen en el genogrupo 1 y 5, lo que mantiene coherencia con el árbol filogenético construido con las secuencias de 523 pb. En este árbol es posible ver una separación más detallada de las ramas, dejando entrever que las secuencias obtenidas en este trabajo, junto con las de referencias chilenas, forman un subgrupo en el Genogrupo 1, que se encuentra separado de las secuencias de referencia por un *bootstrap* de 89. En el caso del Genogrupo 5 igualmente se forma un subgrupo, aunque no exclusivamente chileno, si no que se pueden observar cepas de referencia Noruegas como NVH-103, NVH-107 y N-139 e Irlandesas como I-1.

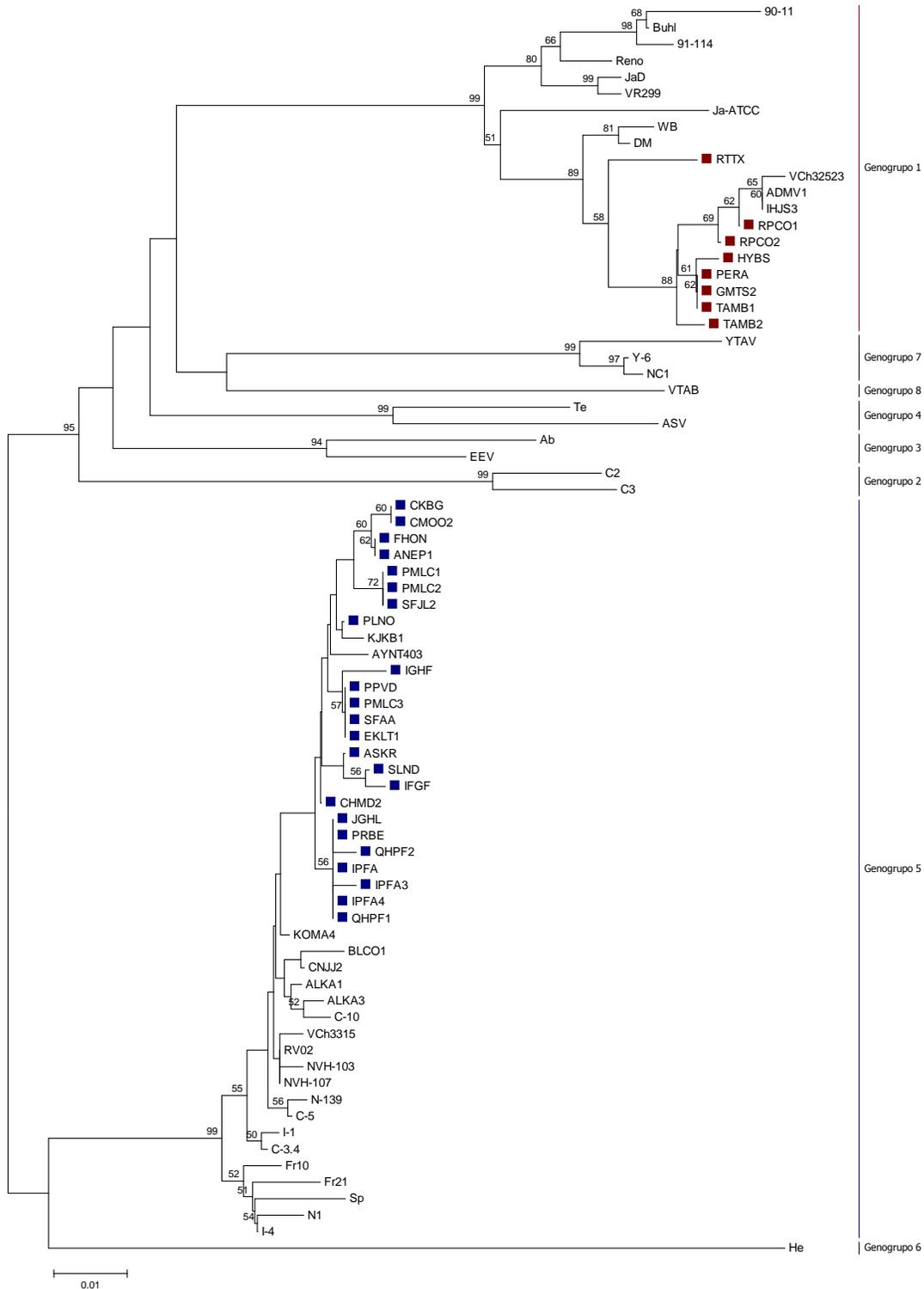


Figura 23. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias de 1180 pb analizadas en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificadas con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente.

En la Figura 24 se representa el segmento A completo de 15 de los aislados secuenciados en este trabajo y se observa la separación en los Genogrupos 1 y 5. En el Genogrupo 1 se presentan las secuencias completas del segmento A disponibles en el GenBank, principalmente provenientes de Norteamérica. Las secuencias de virus IPN pertenecientes a este trabajo, junto con las de referencias chilenas, se congregan en un grupo aparte de secuencias de referencia (e.g. Jasper, 19G7e y WB). Esta separación presenta una alta robustez, con un *bootstrap* de 99.

De manera similar las secuencias de este trabajo se observan agrupadas en el Genogrupo 5 junto con otros aislados chilenos (e.i., MPA1 y KJKB3). Separadas de un segundo subgrupo por un *bootstrap* de 100, el cual contiene tanto cepas europeas (e.g., Sp, Sp116, Sp122 y NVI-013) como chilenas (e.g., CNJJ2, CGPC1, ALKA2) reportadas en otros trabajos

La Figura 25, que muestra la separación del segmento B del virus, en los dos genogrupos ya descritos, muestra un patrón similar, diferenciándose del segmento A, ya que en este caso no se observan solo aislados chilenos en el genogrupo 1, junto con ellos también aparece la cepa WB (West Buxton), AF078668 y 19G7e. Tampoco se observa para el genogrupo 5 una separación en subgrupos. Cabe aclarar que para las secuencias completas del virus IPN no se encuentran disponibles las mismas previamente utilizadas para construir los árboles de 523 y 1180 pb.

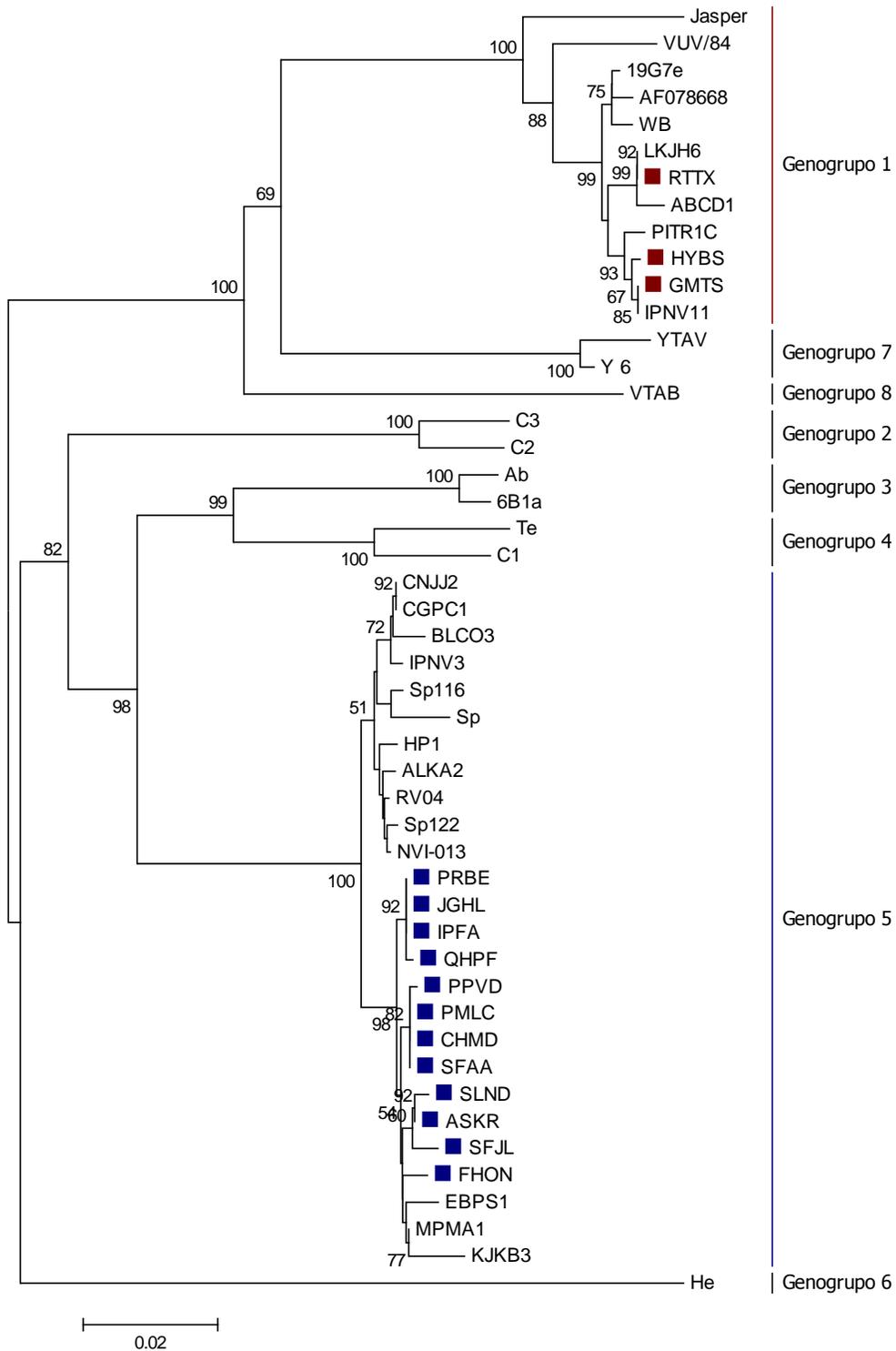


Figura 24. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias del segmento A en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificados con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente.

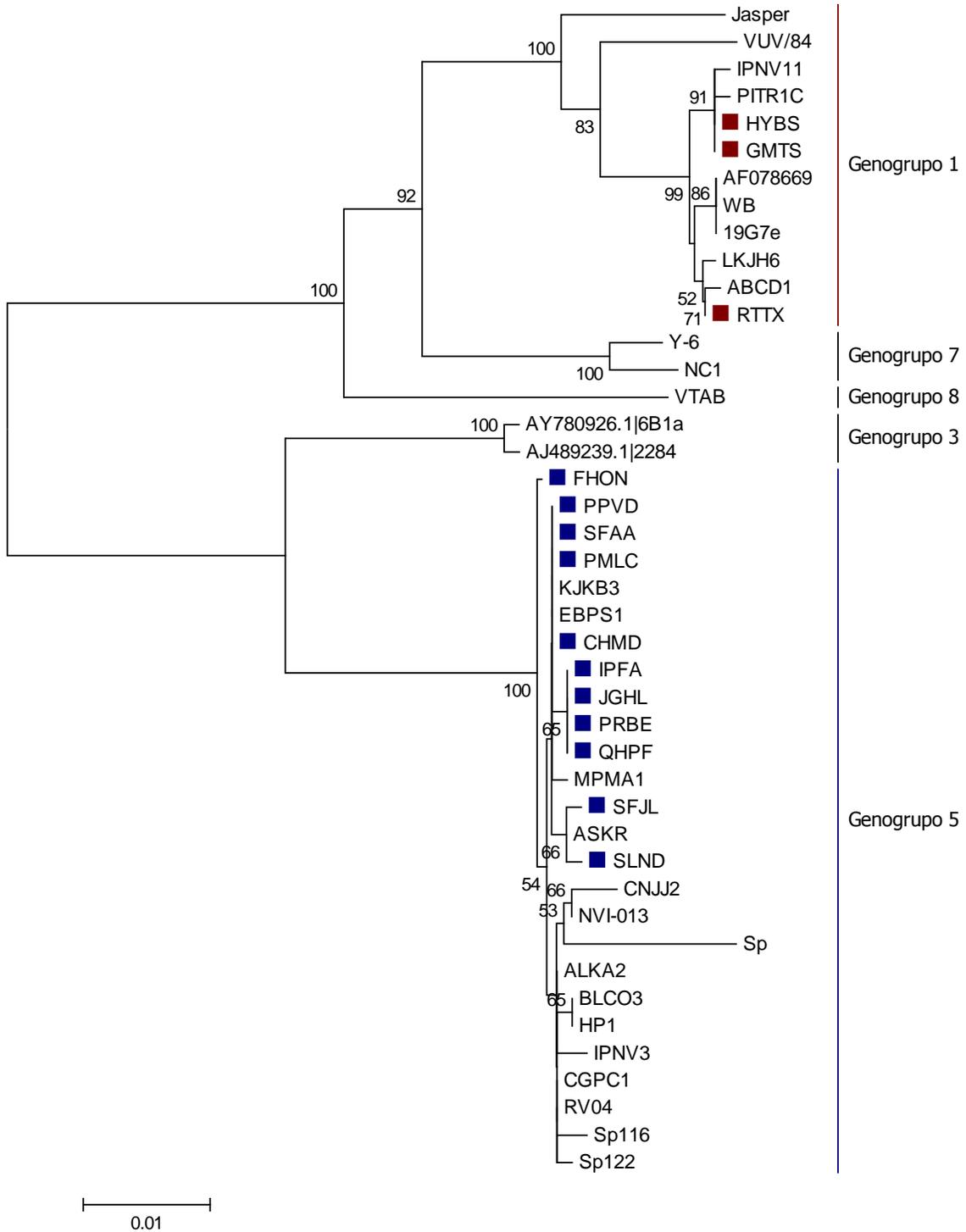


Figura 25. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias del segmento B en este trabajo y los principales genogrupos identificados en la literatura. Identificadas con cuadrados rojos y azules se destacan los genogrupos 1 y 5, respectivamente.

## Marcadores de Virulencia

En la Tabla 13 se muestran los aminoácidos determinantes de virulencia, según Santi *et al.* (2004), Song *et al.* 2005 y Bruslind & Reno (2000), presentes en el segmento A (VP2), y según Shivappa *et al.* (2004), para el segmento B (VP1). Para el segmento A, fue posible realizar la búsqueda de estos residuos aminoacídicos en el amplicón de 1180 pb, cuyo largo permitió observar las posiciones 217 y 221. Adicionalmente, se contó con los fragmentos completos de algunos aislados (ver Tabla 10), de manera que fue posible corroborar los aminoácidos resultantes. Para determinar los marcadores de virulencia reportados en el segmento B, solo se pudo trabajar con las secuencias completas que pudieron obtenerse.

Los virus analizados pertenecientes a los muestreos CHMD, SFAA, ASKR, QHPF, FHON, SLND, PPVD, IFGF, IPFA, JGHL, PRBE, IPFA2°, ANEP, EKLT y PMLC presentaron la combinación de aminoácidos Treonina 217 y Alanina 221, por lo que fueron clasificados como virulentos. En este último centro se destaca que solo el virus PMLC3 fue catalogado como virulento, mientras que en PMLC1 y PMLC2 se observaron aminoácidos asociados a aislados más bien avirulentos. También fueron avirulentos los aislados con código PLNO, CKBG, CMOO e IGHF. Tanto los aislados virulentos como avirulentos, pertenecieron al Genogrupo 5.

Por otro lado, los virus provenientes de los muestreos GMTS, RTTX, HYBS, PERA, TAMB y RPCO (todos ellos pertenecientes al Genogrupo 1) fueron clasificados como avirulentos, de acuerdo a Song *et al.* (2005), y moderadamente virulentos, según Bruslind & Reno (2000) por presentar el residuo Treonina en la posición 221.

Los resultados referentes a los aminoácidos asociados a virulencia en VP1 no fueron concluyentes, ya que no presentaron una combinación que pudiera asociarse a un aislado virulento o avirulento.

Tabla 13. Residuos de aminoácidos presentes en el segmento A (VP2) y B (VP1), en posiciones asociadas a motivos de virulencia de acuerdo a Santi *et al.* (2004), Song *et al.* (2005), Bruslind & Reno (2000) y Shivappa *et al.* (2004) Ensombrecidos aislados virulentos. A=Alanina, T=Treonina, I=Isoleucina, H=Histidina, ND=No disponible, IND=Indeterminado.

Genogrupos	Muestras	VP2		VP1			Virulencia VP2	Virulencia VP1
		217	221	125	154	240		
5	CHMD2	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	SFAA1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	SFAA2	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	SFJL2	T	T	I	I	H	Avirulento	IND
	ASKR1	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	ASKR2	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	QHFP1	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	QHFP2	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	FHON1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	FHON2	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	PMLC1	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-
	PMLC2	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-
	PMLC3	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	SLND1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	SLND2	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	PPVD1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	PPVD2	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	IFGF1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	IFGF2	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	IPFA1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	IPFA2	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	JGHL1	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	JGHL2	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	PRBE1	T	A	I	I	H	Virulento	IND
	PRBE2	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	IPFA3	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	IPFA4	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	ANEP1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-
	PLNO1	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-
	PLNO2	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-
	CKBG1	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-
	CKBG2	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-
EKLT1	T	A	ND	ND	ND	Virulento	-	
CMOO2	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-	
IGHF1	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-	
IGHF2	T	T	ND	ND	ND	Avirulento	-	
1	GMTS2	A	T	I	I	H	Moderadamente virulento	IND
	RRTX1	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-
	RRTX2	A	T	I	I	H	Moderadamente virulento	IND
	HYBS1	A	T	I	I	H	Moderadamente virulento	IND
	HYBS2	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-
	PERA1	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-
	PERA2	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-
	TAMB1	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-
	TAMB2	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-
	RPCO1	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-
	RPCO2	A	T	ND	ND	ND	Moderadamente virulento	-

## **Distribución Geográfica por Genogrupos-Especie y Asociación con Mortalidad**

En la Figura 26, se observa que el Genogrupo 5 (20 muestreos) se encuentra ampliamente distribuido en todas las regiones muestreadas desde la región de La Araucanía a Magallanes y que en todos los casos se determinó en peces de la especie *Salmo salar*. Por el contrario, el Genogrupo 1 se encontró con menor frecuencia en 6 de los 26 muestreos, en las regiones del Bío-Bío, Los Ríos y Los Lagos, perteneciendo a peces del género *Oncorhynchus spp.*

De acuerdo a la Figura 27, no se observa una relación particular entre la mortalidad presentada y el genogrupo al que pertenecen los virus aislados. Si se observa que la mayor mortalidad se presentó en aislados del genogrupo 1 código GMTS (máximo de 125.626 peces , semana 3 del 2016), seguido de los aislados código PMLC pertenecientes al genogrupo 5, en cuyo centro se observó una mortalidad máxima cercana a los 100.000 peces (semanas 38-39 del 2016) y en tercer lugar estaría el centro desde donde se aislaron los virus códigos ASKR, SLND e IFGF, con una mortalidad máxima de 66.313 peces (semana 23 del 2016).

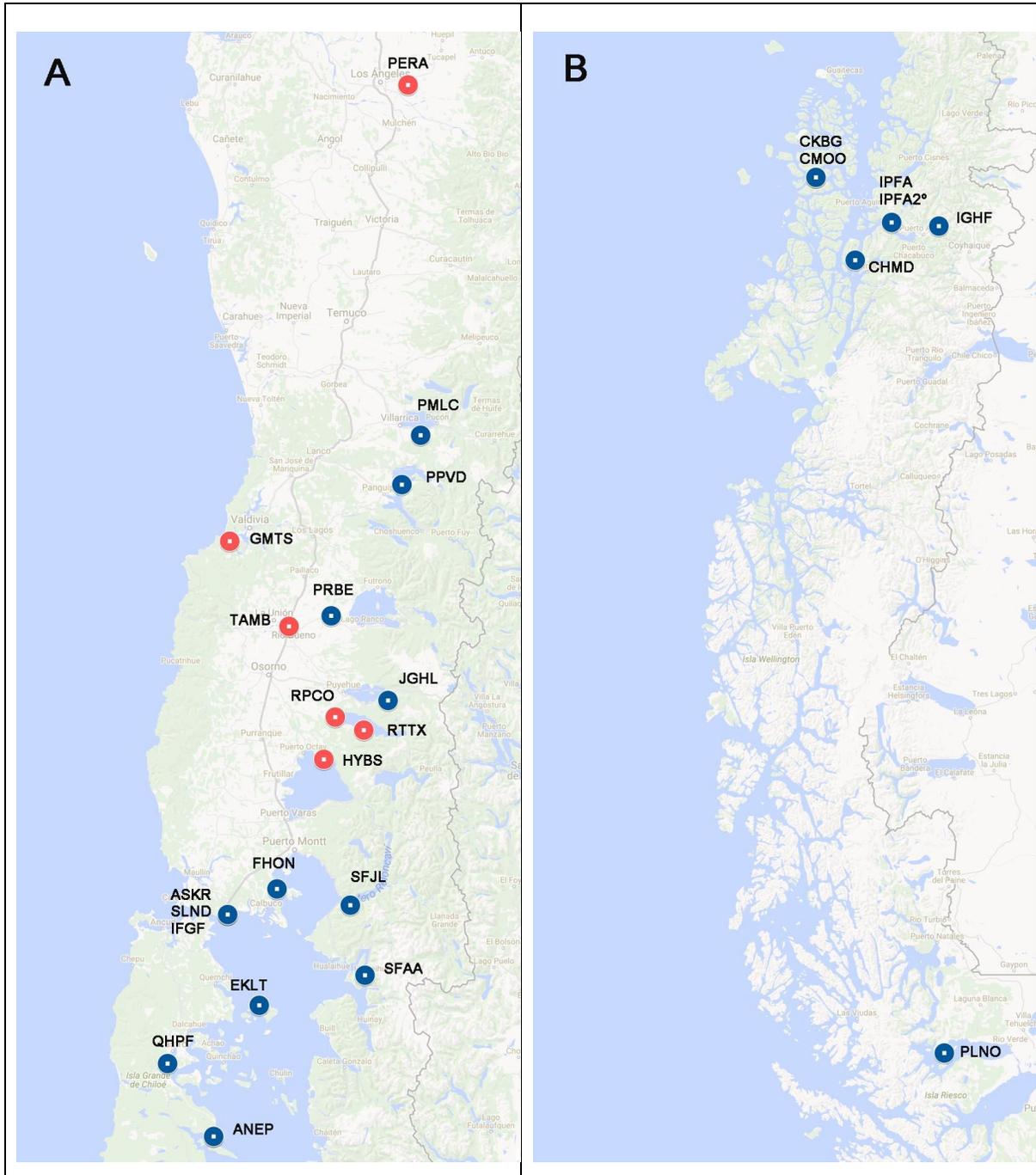


Figura 26. Mapa que muestra la distribución geográfica de los genogrupos por especie. ●: Genogrupo 5, *Salmo salar*, ●: Genogrupo 1, *Oncorhynchus spp.* A: Región Bio-Bío a los Lagos, B: Región de Aysén y Magallanes.

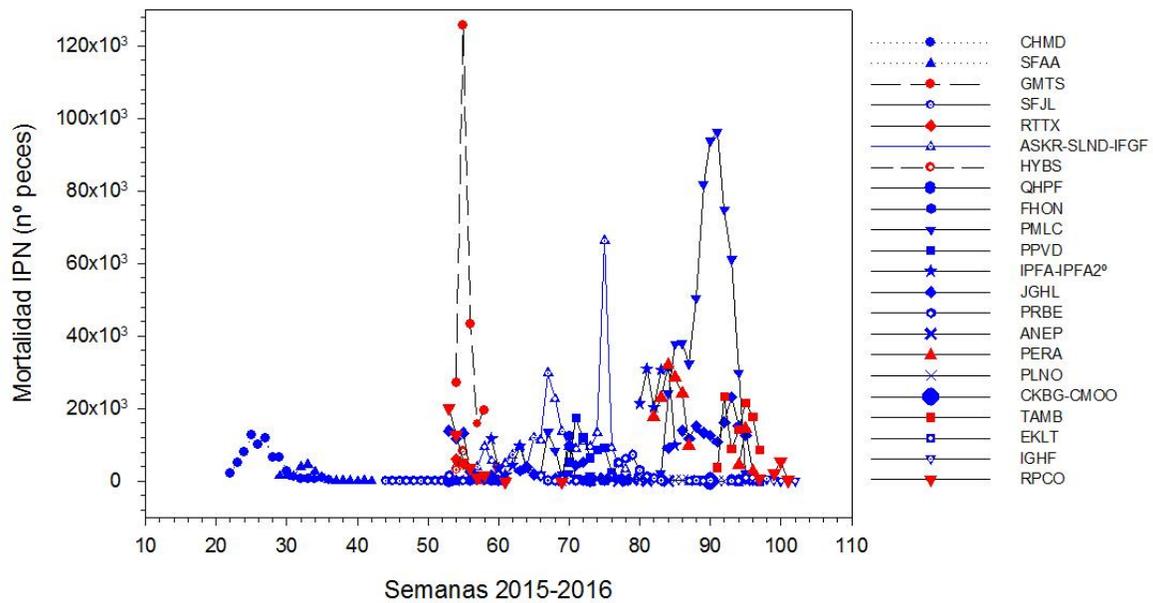


Figura 27. Mortalidad por IPN presentada en los 26 centros muestreados, desde la semana 20-52 del 2015, más las semanas 1-50 del 2016. El color azul y rojo de los diferentes símbolos indica virus genogrupo 5 y 1, respectivamente.

### *RESULTADOS OBJETIVO 3*

#### **Etapa de recepción de encuestas epidemiológicas e información de los casos según semana epidemiológica y construcción de la base de datos.**

Durante el estudio se obtuvo información de 25 centros con reportes a SERNAPESCA de mortalidad asociada a IPN y de 62 centros que no presentaron la enfermedad y que respondieron en forma voluntaria a la encuesta. De acuerdo a la información proporcionada por la autoridad sanitaria en el estudio, se trabajó con el 100% de los centros que reportaron la enfermedad entre agosto del año 2015 a marzo del 2017.

En función de lo expuesto se presentaran los resultados preliminares del análisis con la información de 24 centros casos y 62 centros controles, a su vez destacar que los resultados de los modelos finales pueden variar al obtener a información de factores estresores que será entregada por SERNAPESCA.

#### **Determinar factores de riesgo y protectivos en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa.**

##### *Descripción epidemiológica*

En cuanto a la descripción epidemiológica, como podemos observar en el Tabla 14, es posible indicar que los brotes de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa fueron causados por dos genogrupos del virus, el 1 y el 5, siendo predominante el genogrupo 5 en el 73,9% de los centros afectados y en un 26,0 % del genogrupo 1.

La enfermedad se presentó en centros de producción de salmónidos, en fase de agua dulce y de mar con un 56,0 % y 44,0 % respectivamente, siendo afectadas varias especies, como *S. atlántico* (*S. salar*) en mayor porcentaje 72%, seguido de salmón coho (*O. kisutch*) y la trucha arco iris (*O. mykiss*) con un 12,0% y 16,0% respectivamente. En cuanto al nivel de desarrollo de los especímenes, se observó la presentación de la enfermedad en individuos en fases iniciales de desarrollo (72 %), así como también como en etapas de engorda del proceso productivo (28 %).

La distribución geográfica de los centros con la enfermedad del estudio indica, que se encuentra diseminada en las principales regiones productoras de salmónidos en el país, desde la región del Bío-Bío hasta Magallanes. En cuanto a presentación en el tiempo de los brotes, se

observó que se presentan a largo de todo el año tanto en las estaciones de invierno (36,0%), primavera (28,0%), otoño 20,0% y en verano (16,0 %).

Tabla 14. Caracterización epidemiológica de los brotes de IPNV en centros del estudio entre el periodo de agosto 2015- marzo 2017.

Variables	Centros con brote de IPN	
	n°	%
<b>Geno grupo del virus</b>		
Geno grupo 1	6	26,0
Geno grupo 5	17	73,9
Total	23	100
<b>Tipo producción</b>		
Mar	11	44,0
Agua Dulce	14	56,0
Total	25	100
<b>Especies</b>		
<i>S. salar</i>	18	72,0
<i>O. kisutch</i>	3	12,0
<i>O. mykiss</i>	4	16,0
Total	25	100
<b>Nivel desarrollo</b>		
Alevines-smolt	18	72,0
Adultos	7	28,0
Total	25	100
<b>Regiones</b>		
Bío-Bío	1	4,0
La Araucanía	1	4,0
Los Ríos	2	8,0
Los Lagos	12	48,0
Aysén	8	32,0
Magallanes	1	4,0
Total	25	100
<b>Estación del año</b>		
Invierno	9	36,0
Primavera	7	28,0
Otoño	5	20,0
Verano	4	16,0
Total	25	100

### *Medidas preventivas utilizadas por la industria*

Entre las medidas preventivas para controlar la aparición de la enfermedad en los centros de cultivos (Tabla 15), se describe el evitar la utilización de ovas de reproductores infectados, en relación a la pregunta sobre la evaluación de los reproductores en los centros informantes, estos indicaron que realizan screening y que éstos pueden ser en pools (casos 16% y controles 27,4%) o individuales (casos 52,0% y controles 40,3%), esta medida es obligatoria en Chile. En relación de la condición de portador en aquellos peces que han sobrevivido a un brote, se les consulto si tenían conocimiento del estado sanitario de los peces relacionados a eventos de IPN en la fase de agua dulces. Como respuesta se obtuvo que sobre el 80% de los encuestados poseían antecedentes.

En cuanto a las vacunaciones solo un 9,7% de los encuestados informaron no haber vacunado, estos centros estaban dentro del grupo de centros sin brotes de la enfermedad. De los centros que informaron sobre las vacunaciones realizadas, se identificaron 5 vacunas comerciales, las cuales fueron; ALPHAJECT®, BLUEGUARD®, IPE VAC®, AQUAVAC SARISTIN® y AQUATEC2®. Las vacunaciones se efectuaron ya sea con el uso de una sola vacuna en la mayoría de los centros y en algunos se utilizó más de una vacuna en los diferentes lotes o bacht de peces, situación evidenciada tanto en centros con brotes y sin brotes (16,7% y 16;1%). La vacuna más utilizada fue la ALPHAJECT®, aplicada ya sea en forma única o combinada con otras vacunas. La vía de aplicación más frecuentemente realizada fue inyectable para ambos grupos (44,0% y 58,1%), seguida por inmersión y en menor frecuencia la vía oral. Al analizar los eventos estresantes se pudo observar que un alto porcentaje (casos 72,0% y controles 88,7%) de los centros informaron haber tenido algún evento estresor en el periodo del estudio, ya sea por manejos productivos, sanitarios, de tipo ambiental, por brotes de otras enfermedades o ataques por depredadores.

Tabla 15. Descripción de medidas preventivas utilizadas para el control de IPNv en centros de agua dulce y de mar.

	Centros con brotes de IPNv (casos)		Centros sin brotes de IPNv (controles)	
	n°	%	n°	%
<b>Screening reproductores</b>				
Individual	13	52,0	25	40,3
Pooles	4	16,0	17	27,4
Ind. + pooles	2	8,0	3	4,8
Sin información	6	24,0	17	27,4
Total	25	100	62	100
<b>Centros de mar:</b>				
<b>Antecedentes previos de brotes de IPN en etapa de agua dulce</b>				
Si	1	9,1	6	18,8
No	10	90,9	26	81,2
Total	11	100	32	100
<b>Vacunaciones</b>				
ALPHA JECT®	4	16,0	27	43,5
BLUEGUARD®	7	28,0	5	8,1
IPE-VAC®	6	24,0	6	9,7
AQUATEC 2®	1	4,0	0	0
AQUAVAC SARISTIN®	1	4,0	0	0
Combinación vacunas	4	16,0	10	16,7
No vacuna	0	0	6	9,7
Sin información	2	8,0	8	12,9
Total	25	100	62	100
<b>Vías de aplicación de las vacunas</b>				
Inyectable	11	44,0	36	58,1
Inmersión	5	20,0	6	9,7
Oral	1	4,0	0	0
Aplicación combinada	6	24,0	6	9,6
No vacuna	0	0	6	9,7
Sin información	2	8,0	8	12,9
Total	25	100,0	62	100
<b>Eventos estresantes previo al brote</b>				
Si	18	72,0	55	88,7
No	7	28,0	7	11,2
Total	25	100,0	62	100

En el análisis univariado se determinó que las siguientes variables; número de veces que ingresan peces en los centros, estación del año, flujo del agua, y vacunas que se utilizan, fueron identificadas como factores de riesgo y protectivos, sin embargo al realizar el análisis multivariado solo fueron significativas y de carácter protector la utilización de la vacuna ALPHAJECT en relación a las demás vacunas, como otro factor protector aparecen las estaciones del año invierno-verano frente a otoño-primavera. En cambio se determinó que el haber tenido una enfermedad anterior a IPN es un factor de alto riesgo, en otras palabras, cuando un centro presenta un cuadro de enfermedad existe una alta probabilidad de presentar IPN (Tabla 16).

Tabla 16. Modelo final del análisis multivariado regresión logística para la determinación de los factores de riesgo y protectivos en peces de cultivo en mar y agua dulce.

Nombre variable		Odd ratio	IC	P-valor
Vacunas	ALPHAJECT	0,001	0,001-0,712	0,0428
	Otras vacunas			
Estación del año	Invierno-verano	0,001	0,01-0,58	0,0371
	Otoño-primavera			
Otras brotes de enfermedad	Con brotes	>3,01	3,01-inf	0,0324
	Sin brotes			

A continuación, se realizará un análisis epidemiológico considerando las características propias de los centros en función del sistema productivo.

#### *Análisis epidemiológico en centros de agua dulce*

Las características productivas de los centros del estudio, nos indican que el personal que maneja los peces varía entre 2 hasta 56 personas, en centros de mayor tamaño, presentándose como media 28,9 trabajadores para centros casos y 19,8 en los centros control, entre los grupos no se encontró diferencias significativas. En cuanto al tamaño de los centros, en función del número de estanque poblados con peces, se observó que el grupo control posee una alta variabilidad con un mínimo de 5 estanques y un máximo de 1269, con un promedio de 90 estanques, en cambio los centros casos presentaron un menor tamaño (min.10-max. 164 y media 52,6), a pesar de esto, no se determinó que estas diferencias sean significativas. En cambio, se obtuvieron diferencias significativas en relación al número de veces que ingresaron

peces y el origen de éstos. Otra variable, fue el número de vacunas utilizadas en el proceso productivo para el control de IPNV, utilizándose en los centros casos hasta 3 tipos diferentes de vacunas. A pesar que los centros controles presentaron una mayor densidad (30,3 kg/m<sup>3</sup>) que los centros no se determinó diferencias significativas entre grupos (Tabla 17).

Tabla 17. Caracterización productiva de los centros de agua dulce con y sin brotes de IPNV.

	<b>Centros con brotes de IPNV n=14</b>	<b>Centros sin brotes de IPNV n=29</b>	<b>Test t/Wilcoxon</b>
<b>Número de trabajadores</b>			
Media ± Ds	28,9±14,5	19,8±12,7	p=0,08
Min.-Max.	10-51	2-56	
<b>Número de estanques poblados</b>			
Media ± Ds	52,6±43,8	90,3±231,8	p=0,96
Min.-Max.	10-164	5-1269	
<b>Número de veces de ingresos de peces</b>			
Media ± Ds	4,8±2,24	2,95±2,1	p=0,009
Min.-Max.	1-8	1-9	
<b>Número de Centros de origen</b>			
Media ± Ds	2,5±1,2	1,5±1,0	p=0,02
Min.-Max.	1-5	0-4	
<b>Número de vacunas</b>			
Media ± Ds	1,7±0,6	1,2±0,4	p=0,01
Min.-Max.	1-3	1-2	
<b>Densidad</b>			
Media ± Ds	19,2±17,5	30,3±17,7	p=0,08
Min.-Max.	0,4-55	3-96,4	

En cuanto a otras variables relacionadas con la aparición de la enfermedad, podemos observar que gran parte de los centros ya sea con o sin brote utilizan ovas de origen nacional, así como ingresan peces de su propia producción. Otras variables analizadas fueron el tipo de flujo del agua (abiertos y cerrados), así como las practicas desinfectar los afluentes y de desarmar y desinfectar las tuberías de los estanque, sin embargo estas no presentaron una asociación significativa con la presentación de la enfermedad. En cambio, al evaluar quién realiza el proceso de desinfección se encontró diferencias significativas cuando la realiza la propia empresa en relación a que lo ejecute una empresa externa (Tabla 18).

Tabla 18. Descripción del origen de las ovas, peces y de actividades asociadas al proceso de limpieza y desinfección de los centros de agua dulce según presentación de brote.

	Centros con brotes de IPNv		Centros sin brotes de IPNv		Test X <sup>2</sup>
	n°	%	n°	%	
<b>Origen de las ovas</b>					
Nacional	12	85,7	26	89,7	p=0,33
Nac+ imp	1	7,1	0	0	
Sin información	1	7,1	3	10,3	
Total	14	100	29	100	
<b>Origen de los peces</b>					
Terceros	5	28,6	8	27,6	p=0,70
Propios	8	51,7	21	72,4	
Sin información	1	7,1	0	0	
Total	14	100	29	100	
<b>Flujo</b>					
Abierto	8	57,1	22	75,9	p=0,45
Cerrado	2	14,3	2	6,9	
Mixto	4	28,6	4	13,8	
Sin inf.	0	0	1	6,4	
Total	14	100	29	100	
<b>Limpieza del centro</b>					
Empresa Externa	6	42,9	5	17,2	p=0,053
Propia	6	42,9	23	79,3	
Sin información	2	14,3	1	3,4	
Total	14	100	29	100	
<b>Desarma tubería en la limpieza</b>					
No	4	28,6	15	51,7	p=0,1
Si	7	50,0	13	44,8	
No aplica	1	7,1	1	3,4	
Sin información	2	14,3	0	0	
Total	14	100	29	100	
<b>Desinfección afluentes</b>					
No	5	35,7	8	27,6	p=0,58
Si	9	64,3	21	72,4	
Total	14	100	29	100	

Del análisis multivariado realizado, solo se logró determinar que la limpieza realizada por los propios centros es un factor protector en la presentación de los brotes de IPN en centros de agua dulce (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados del análisis multivariado regresión logística para la determinación de los factores de riesgo y protectivos en peces de cultivo de agua dulce.

Nombre variable		Odd ratio	IC	P-valor
Limpieza del centro	Por la propia empresa	0,175	0,035-0,87	0,035
	Por empresa externa			

#### *Análisis epidemiológico en centros de mar*

Se analizó un total de 11 centros casos y 33 centros controles en donde se determinó que en promedio el número de trabajadores fue de 10, con valores mínimos de 2 y un máximo de 17. Los centros controles presentaron en promedio 19,2 jaulas a diferencia de los centros casos con 15,4 jaulas (mín 10 max. 23 jaulas). Los centros ingresaron peces hasta 5 veces en el periodo del estudio con una media similar en los centros casos y controles en torno a 2 ingresos. El origen de los peces en algunos centros fue de hasta 3 centros diferentes.

En cuanto a medidas preventivas, se determinó que algunos centros no realizan vacunaciones en la fase de mar, en cambio otros indicaron que realizan hasta 5 actividades de vacunación durante el proceso productivo, siendo en promedio 2 eventos preventivos. Los tipos de vacunas comerciales utilizadas fluctuaron entre 1 a 2. Se destaca una alta densidad en los centros controles en relación a los centros con IPN (Tabla 20).

Tabla 20. Caracterización productiva de los centros de mar con y sin brotes de IPNV.

	Centros con brotes de IPNV n=11	Centros sin brotes de IPNV n=33	Test t/Wilcoxon p
<b>Trabajadores</b>			
Media $\pm$ Ds	10,0 $\pm$ 3,5	9,9 $\pm$ 4,0	p=0,32
Min.-Max.	3-17	2-23	
<b>Jaulas pobladas</b>			
Media $\pm$ Ds	15,4 $\pm$ 5,1	19,2 $\pm$ 4,2	p=0,4
Min.-Max.	10-24	10-30	
<b>Ingresos de peces</b>			
Media $\pm$ Ds	2 $\pm$ 1	2,2 $\pm$ 1,5	p=0,2
Min.-Max.	1-4	1-5	
<b>Centros de origen</b>			
Media $\pm$ Ds	1,5 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,5	p=0,55
Min.-Max.	1-3	1-2	
<b>Vacunaciones</b>			
Media $\pm$ Ds	2,5 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 1,4	p=0,03
Min.-Max.	1-5	0-4	
<b>Tipos de vacunas</b>			
Media $\pm$ Ds	1,4 $\pm$ 0,7	1 $\pm$ 0,6	p=0,07
Min.-Max.	1-2	0-2	
<b>Densidad</b>			
Media $\pm$ Ds	1,8 $\pm$ 1,2	8,0 $\pm$ 5,1	p=0,003
Min.-Max.	0,3-3,5	1-15	

En cuanto al material biológico, en los centros de mar predominaron las ovas de origen nacional sobre el 85%. El medio por el cual se trasladan de los peces a los centros mar, no fue de uso exclusivo para el traslado de los peces, este fue compartido con otros movimientos operacionales de la empresa. Con respecto al material de la malla de las jaulas este fue de nylon en 55,9% de los controles, en cambio predominó el poliéster en los centros casos. El impregnar las mallas fue una práctica que realizan el 54,5% de los casos, siendo menor esta práctica en los centros controles. Finalmente al evaluar el lavado *in situ* de las mallas, esta práctica fue realizada en mayor porcentaje en los centros controles con un 55,9% (Tabla 21).

En función de los resultados no se logró determinar asociación entre las prácticas realizadas por los centros y la aparición de la enfermedad, esto podría deberse a: 1) que en realidad no existe asociación de estadística o que 2) el tamaño de la muestra relacionada con el número de centros casos que participaron en el estudio, fue bajo, por lo que no

permite evidenciar asociación epidemiológica y estadística. En relación a este punto, se informó a la autoridad del bajo número de casos encuestados, la cual indicó que en el periodo de estudio se presentaron una baja prevalencia de la enfermedad en centros de mar.

Tabla 21. Descripción del origen de las ovas y de actividades asociadas al proceso de limpieza y desinfección de los centros de mar según presentación de brote.

	Centros con brotes de IPNv		Centros sin brotes de IPNv		Test X <sup>2</sup>
	n°	%	n°	%	
<b>Origen de las ovas</b>					
Nacional	12	85,7	26	89,7	p=1,0
Nac+ imp	1	7,1	0	0	
Sin información	1	7,1	3	10,3	
Total	11	100	33	100	
<b>Tipo de traslado de los peces o siembra</b>					
Compartido	7	63,6	12	35,3	P=0,29
Exclusivo	4	36,4	18	52,9	
S/I			3	11,8	
Total	11	100,0	33	100,0	
<b>Tipo de malla</b>					
Nylon	3	27,3	19	55,9	P=0,71
Poliester	7	63,6	15	44,1	
Total	10	90,9	34	100,0	
<b>Impregnadas</b>					
No	4	36,4	21	61,8	P=0,28
Si	6	54,5	13	38,2	
Total	10	90,9	34	100,0	
<b>Lavado de mallas</b>					
In situ	3	27,3	19	55,9	P=0,16
Taller	8	72,7	15	44,1	
Total	11	100,0	34	100,0	

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Como parte del objetivo 1, se completó la revisión bibliográfica del virus IPN y la enfermedad que produce, utilizando literatura indexada en las principales bases de datos online, y no indexada, considerando trabajos nacionales e internacionales. En este informe se presenta la revisión bibliográfica con un avance del 100%, de acuerdo a lo comprometido en la carta Gantt.

En relación al objetivo 2, se han realizado 26 muestreos en total, 18 corresponden a pisciculturas y 8 a centros de mar, distribuidos en las Regiones del Bío-Bío, La Araucanía, Los Lagos, Los Ríos, Aysén y del General Carlos Ibáñez del Campo y Magallanes. De estos muestreos, 20 son de la especie *S. salar*, 3 de *O. kisutch* y 3 de *O. mykiss*; 10 de ellos corresponden a alevines, 12 a smolt y 4 a peces adultos. Esto representa un 86,7% de los muestreos que se esperaba realizar de acuerdo a la aparición de brotes de IPN en los centros de cultivo que se encuentran funcionando en el país. Los muestreos se realizaron de acuerdo a la aparición de brotes y/o signos clínicos, además de confirmación por técnicas de diagnóstico de los centros, por lo cual en algunos casos no se consideran como casos para el análisis del tercer objetivo. La misma razón es por lo cual no se llegó a los 30 centros muestreados, no se presentó la cantidad de brotes esperados durante el periodo de muestreo.

Se analizaron las 53 muestras de tejidos de peces obtenidos de estos muestreos, mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFAT), dos técnicas de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) y un PCR anidado, para determinar la presencia del virus IPN. Además, se realizó el aislamiento en cultivo celular de las cepas para su caracterización y construcción del cepario. Los resultados obtenidos para estos análisis de diagnóstico, muestran que, del total de muestras recibidas y analizadas, la mayoría (39) resultó positiva para al menos una de las técnicas empleadas, siendo la técnica de PCR anidado la que logró detectar el virus en un mayor número de muestras (50). Una ventaja de esta técnica es que, permite concentrar material genético de virus que se encuentra con una menor carga viral en los tejidos de los peces, lo que permite su diagnóstico y a la vez con este material genético se puede lograr secuenciar virus que no logran ser aislados en cultivo celular. Las dos técnicas de PCR en tiempo real (qRT-PCR VP1 y VP2) mostraron resultados similares a los obtenidos mediante IFAT, la mayoría de las muestras que resultaron positivas para IFAT también lo fueron para

los ensayos de qRT-PCR, especialmente en el caso de muestras con valores de Ct bajos, i.e. con una alta cantidad de material genético del virus.

En general, los resultados de las distintas técnicas de diagnóstico muestran que casi todas las muestras recibidas provenían de peces infectados con el virus IPN, ya sea de forma aguda; ejemplificado en muestras que resultaron ser positivas para todos los análisis (e.g. SFAA, ASKR, FHON, SLND, PPVD, IFGF, PRBE, IPFA2°, PERA, TAMB, RPCO) o de forma crónica (infectados persistentemente), observado en muestras negativas para los análisis de qRT-PCR (e.g. SFJL, RTTX, PLNO, EKLT) o con valores de Ct muy altos, i.e. con baja cantidad de material genético de IPNV (i.e., IPFA, JGHL, HYBS, CKBG, CMOO). Lo que es consistente con las mortalidades observadas en los centros de cultivo al momento de la toma de estas muestras, ya que en la mayoría de los centros con muestras positivas y Cts bajos (casos agudos), persistía una mortalidad por IPN alta a la fecha del muestreo, mientras que en los centros con muestras negativas y/o con Cts altos, la mortalidad asociada era nula o muy baja al momento del muestreo, correlacionándose con casos crónicos o persistentes de infección.

Esto también se vio reflejado en el título viral de las muestras que lograron ser analizadas mediante la técnica descrita por Espinoza et al. (2002), en donde se realiza un conteo de las células fluorescentes a las 18-20 horas post infección para estimar el número de virus con capacidad infectiva en las muestras. La mayoría de las muestras que presentaron valores bajos de Ct (<25) en alguno de los ensayos de qRT-PCR pudieron ser tituladas mediante la técnica y mostraron títulos virales altos (>10<sup>3</sup> CF/ml) (e.g. SFAA, GMTS2, ASKR2, FHON, SLND, PPVD, IFGF, PRBE, PERA, TAMB) asociados a casos clínicos agudos de la enfermedad (Espinoza et al. 2002). No obstante, en algunos casos no se correlaciona el título viral con los Ct obtenidos en los ensayos de qRT-PCR, como por ejemplo las muestras de código CKBG, las cuales presentaron Cts muy altos (al borde de la detección) y tuvieron un título viral asociado a un caso agudo (10<sup>3</sup> - 10<sup>6</sup> CF/ml). Cabe destacar que el centro en donde se tomaron estas muestras no presentó un brote de IPN, sólo se observaron hallazgos asociados a la enfermedad en 11 peces, semanas antes del muestreo, y al momento del muestreo no se registró ninguna mortalidad por IPN. Esto indica que los peces muestreados debieron ser portadores asintomáticos del virus, ya que se logró aislar IPNV de estas muestras, y además fueron positivas para la técnica de IFAT.

A pesar de que se presentaron leves diferencias en el diagnóstico del virus a través de técnicas moleculares y de inmunofluorescencia, el aislamiento de IPNV en cultivo celular fue exitoso en el 100% de los casos, obteniéndose al menos un aislado de cada centro muestreado (50 en total), los cuales fueron almacenados como parte del cepario requerido en el proyecto.

En relación a la presentación de los signos clínicos macroscópicos de la enfermedad, de las muestras analizadas se observa que casi la totalidad presentaron de dos a tres signos agudos atribuibles a IPN (i.e. GMTS, ASKR, FHON, PMLC, PPVD, IFGF, IPFA2°, ANEP y RPCO), algunas más de cuatro a cinco signos agudos para IPN (i.e., CHMD, SFAA, PLNO, CKBG, TAMB e IGHF), y otras con signos menos específicos, con uno o ningún signo agudo para IPN (i.e. SFJL, RTTX, HYBS, QHPF, CMOO, IPFA, JGHL, PRBE, EKLT y CMOO). Esta información se corrobora con los resultados histopatológicos ya que los peces con signología aguda para IPN mostraron lesiones necróticas y apoptóticas en los tejidos analizados. Asimismo, en los peces con signología inespecífica, se observó ya sea signos de una infección subaguda a crónica, como hallazgos histopatológicos que no pudieron relacionarse claramente con la enfermedad de IPN, sino mas bien con cuadros clínicos no infecciosos y/o de deficiencia nutricional. Sin embargo, se aislaron virus desde casi todas las muestras, salvo CHMD1, GMTS1 y SFJL1, lo que podría significar que ciertos IPNV aislados se encontraban en fase de infección subclínica, es decir, algunos centros presentaban peces con las secuelas de la infección por IPNV y/o eran portadores del patógeno. En el caso de estas tres muestras donde no se logró aislamiento, presentaron altos Ct (CHMD1, GMTS1) o un valor negativo (SFJL1), y además los resultados de IFAT fueron negativos. Para estas muestras, la baja carga viral dificultó el aislamiento y forzó al límite de sensibilidad de la técnica de aislamiento utilizada.

Los resultados observados en la signología clínica e histopatología coinciden con los resultados de las técnicas de qRT-PCR e IFAT, ya que se pueden asociar en la mayoría de los casos altas cargas virales, es decir, Ct bajos, y positividad en los IFAT con peces que mostraron una signología aguda por IPN (e.g., SFAA, GMTS2, FHON, PPVD, PRBE, TAMB y RPCO). Los muestreos con código CKBG y PLNO, fueron una excepción, ya que los resultados muestran Ct sobre 29 o negativos, aunque con títulos positivos y especialmente altos para CKGB2, presentando signos más específicos y agudos para IPN.

Los peces de los centros código RTTX, IPFA, JGHL, EKLTL fueron mayormente asociados a una infección más bien ligada a la cronicidad y presentaron baja carga viral. Esto está asociado a Ct negativos o muy altos y títulos negativos, con la excepción de JGHL2 cuyo título fue  $2,4 \times 10^3$  CF/ml.

Las muestras código SFJL, HYBS y QHPF según la histopatología se clasificaron como un cuadro inespecífico y no se observó un daño funcional en los órganos para QHPF, ni evidencia de un cuadro infeccioso para HYBS. Apoyando lo anterior HYBS y QHPF no presentaron ningún signo clínico agudo asociado a IPN. Por el contrario, SFJL presentó un solo signo clínico agudo para IPN en dos de los peces muestreados y los demás fueron signos inespecíficos. Los métodos de diagnóstico empleados se relacionan con estos cuadros inespecíficos, ya que los Ct fueron negativos o  $> 25$  y todos los resultados de IFAT fueron negativos, especialmente para las muestras código SFJL en que tanto los resultados de qRT-PCR e IFAT fueron negativos. Sin embargo, por medio de la técnica de PCR anidado, fue detectada la presencia del virus en todas las muestras provenientes de estos muestreos clasificados como crónicos o inespecíficos para IPN. Estos resultados sugieren que los peces muestreados correspondían a portadores del virus.

La falta de información clínica sobre los peces con código SLND no permitió correlacionar los resultados, pero se puede observar que presentan una carga viral alta, con Ct menores a 25, presentando positividad para todas las técnicas analizadas y un fácil aislamiento de los virus presentes.

De acuerdo a la epidemiología molecular, la mayoría de las cepas de virus IPN encontradas en este trabajo pertenecen al Genogrupo 5, y se encuentran distribuidas en todas las regiones examinadas, desde la Región de la Araucanía a la de Magallanes. En éste genogrupo, se agrupan mayoritariamente aislados de virus provenientes de países Europeos como Irlanda, Noruega, Dinamarca y Francia. Por otro lado, solo en seis centros muestreados se encontraron virus que fueron clasificados en el Genogrupo 1, distribuidos en las regiones del Bío-Bío, Los Ríos y Los Lagos, éste genogrupo está representado principalmente por cepas de Estados Unidos y Canadá. Además, se observa una relación hospedador-específica en la cual los aislados del genogrupo 5 son encontrados en la especie *S. salar* y los del genogrupo 1 en las especies de *Oncorhynchus*. Se observó también, que los virus chilenos se agrupan en subtipos especialmente en el genogrupo 1, formando un genotipo de virus chilenos, esto se observa con

mayor claridad en los arboles construidos con el amplicón de 1.180 pb y del segmento A completo. Sin embargo, no se observa esta misma separación al analizar el árbol filogenético construido con el segmento B del virus. Por último, no se encontraron recombinantes en los 15 aislados para los cuales se logró analizar los segmentos A y B completos de los virus.

El análisis de los marcadores de virulencia mostró en general mayor virulencia para los virus del Genogrupo 5 (26 aislados), que para los del Genogrupo 1, ya que éstos últimos fueron todos considerados moderadamente virulentos según los marcadores. La mayoría de las muestras con marcadores para avirulencia registraron mortalidades bajas o nulas asociadas a IPN, mientras que gran parte de los que presentaron marcadores de virulencia registraron mortalidades relativamente altas. Sin embargo, los centros que presentaron mayor mortalidad desde la semana 20-2015 hasta fines del 2016, no necesariamente poseen aislados caracterizados como virulentos, como es el caso de GMTS2, PMLC1 y PMLC2, que resultaron ser moderadamente virulentos y avirulentos, respectivamente. Los aislados de códigos ASKR, PMLC3, IFGF pertenecientes al genogrupo 5, cuyos centros presentaron alta mortalidad, si fueron clasificados como virulentos. Llama la atención que los aislados PLNO y CKBG fueron catalogados como no virulentos presentando Ct negativos, lo cual es razonable, sin embargo, presentaron signos clínicos agudos para IPN y los títulos virales fueron altos, esto último se contradice con la baja carga viral observada en los resultados de qRT-PCR. Lo anterior podría indicar un problema en la especificidad de los partidores de las técnicas de qRT-PCR empleados en la determinación de estos virus. Por otro lado, CKBG no presentó mortalidad y PLNO una mortalidad clasificada como brote, sin embargo, relativamente baja. Otro ejemplo lo representa, EKLT, que resultó ser virulento según los marcadores moleculares; no obstante, el brote registrado para estas muestras presentó una mortalidad semanal máxima de solo 0,07%. Además, según su signología clínica e histopatología se clasificó como un caso crónico para IPN y todos los métodos de diagnóstico dieron resultados negativos, con la excepción del PCR anidado. En consecuencia, en términos generales se observa una relación moderada a débil entre los muestreos que presentaron signología aguda para IPN y la virulencia determinada mediante los marcadores moleculares reportados en la literatura, especialmente en los centros donde se observó mayor mortalidad. Esto es consistente con estudios anteriores, que no han encontrado relación entre las mortalidades vistas en campo y los marcadores de virulencia reportados, y confirma la necesidad de investigar nuevos marcadores moleculares diferenciales para cada genogrupo del virus.

Del análisis epidemiológico relacionado con el objetivo 3, los resultados ratifican los hallazgos en otros estudios de las condiciones epidemiológicas de la presentación de la enfermedad, tales como la presentación de brotes en fases tempranas del sistema productivo así como en etapas de engorda, afectando las principales especies producidas en Chile. Como lo indican otros reportes la enfermedad, ésta diseminada en las principales áreas productivas del país así como su presentación es todas las estaciones del año. Del análisis de las medidas aplicadas por los centros, se pudo determinar que a pesar de que las empresas realizan una serie de actividades para el control de la aparición de los brotes estas medidas no son suficientes. Como evaluación de las medidas preventivas aplicadas tanto en centros de agua dulce y de mar, se determinó que la aplicación de la vacuna ALPHAJECT actúo como factor protectoro frente a la aparición de la enfermedad, al igual que los periodos de invierno- verano. Al realizar un análisis dirigido a solo los centros de agua dulce se determinó que aquellas empresas que realizan su limpieza y desinfección sin contratar empresas externas controlan la mejor manera la aparición de los brotes. En cuanto al análisis de los centros de mar es necesario recolectar información para analizar esta etapa productiva en cuanto a factores de riesgo.

## TALLER DE DIFUSIÓN DE RESULTADOS

El día jueves 26 de enero del 2017 se realizó el taller de difusión de resultados del proyecto FIPA 2014-60 en la ciudad de Puerto Montt. Al taller asistieron representantes de las instituciones públicas involucradas en el proyecto, SERNAPESCA y SUBPESCA, como también de diversas empresas asociadas a la industria de la salmicultura. Como parte del equipo de trabajo del proyecto asistieron, la directora, Dra. Yoanna Eissler, el director alterno, Juan Carlos Espinoza, y los investigadores, Dra. Carla Rosenfeld, David Tapia y Pamela Torres. Durante el taller, la Dra. Eissler realizó una presentación de los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 2, relacionados con el estado del arte de la enfermedad y del virus, y con la caracterización de las distintas cepas presentes en el país. La Dra. Carla Rosenfeld, por su parte, presentó los resultados obtenidos en el objetivo 3, relacionados con la determinación de factores epidemiológicos de riesgo y protectivos para la presentación de IPN. Finalmente, se realizó una mesa redonda de preguntas en donde participaron todos los asistentes al evento, y se discutieron los resultados obtenidos del proyecto. A continuación se presenta el programa del taller, la lista de participantes y las conclusiones obtenidas de la mesa redonda.



Universidad Austral de Chile  
*Conocimiento y Naturaleza*

### PROGRAMA TALLER DE DIFUSIÓN PROYECTO FIPA 2014-60

**Nombre Proyecto:** Determinación de factores epidemiológicos de riesgo en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa

**Fecha:** 26 de Enero del 2017

**Lugar:** Hotel Don Luis, Salón Melipulli

**Dirección:** Quillota 146, Puerto Montt

**14:30 – 15:30 h:** Presentación resultados Proyecto objetivos 1 y 2. Dra. Yoanna Eissler

**15:30 – 15:50 h:** Café

**15:50 – 16:50 h:** Presentación resultados Proyecto objetivo 3. Dra. Carla Rosenfeld

**16:50 – 17:30 h:** Mesa redonda preguntas. Dirige: Dra. Yoanna Eissler P.

A continuación en la Tabla 22 y Figura 28, se muestra la lista de participantes al Taller.

Tabla 22. Lista de participantes al Taller Proyecto FIPA 2014-06

<b>Nº</b>	<b>Nombre</b>	<b>Empresa/Institución</b>
1	Rolando Arias	Subsecretaría de Pesca y Acuicultura
2	Fernanda Pino	ADL Diagnostic Chile SpA.
3	Susana Bravo	ADL Diagnostic Chile SpA.
4	Daniela Urrutia	ADL Diagnostic Chile SpA.
5	Fernanda Brantes	Ventisqueros S.A.
6	Carla Espinoza	Ventisqueros S.A.
7	Paulo Díaz	Salmones Multiexport S.A.
8	Álvaro Gaete	Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
9	Marcela Galant	Australis Mar S.A..
10	Claudina González	Salmones Multiexport S.A.
11	Maureen Alcayaga	Subsecretaría de Pesca y Acuicultura
12	Oswaldo Sandoval	Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
13	Carla Rosenfeld	Universidad Austral de Chile
14	Yoanna Eissler	Universidad de Valparaíso
15	Pamela Torres	Universidad de Valparaíso
16	David Tapia	Universidad de Valparaíso
17	Juan Carlos Espinoza	Universidad de Valparaíso

TALLER DE DIFUSIÓN PROYECTO FIPA 2014-60

“Determinación de factores epidemiológicos de riesgo en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa”

Nº	Nombre	Empresa/Institución	Firma	Correo electrónico
1	Rolando Amador	Sernapesca	[Firma]	rolando.amador@sernapecsa.cl
2	Fernanda Pino	ADL	[Firma]	fernanda.pineda@adl.cl
3	Susana Bravo	ADL	[Firma]	susana.bravo@adl.cl
4	Daniela Urzúa	ADL	[Firma]	danzur@adl.cl
5	Fernanda Bravo	ADL	[Firma]	fernanda.bravo@adl.cl
6	Carla Espinoza	Ventisqueros	[Firma]	carla.espinoza@ventisqueros.cl
7	Paulo Díaz	Multieport	[Firma]	pdiaz@multieport.cl
8	Alonso Gove	Sernapesca	[Firma]	algon@sernapecsa.cl
9	Marcía Golz	ADL	[Firma]	marcia.golz@adl.cl
10	Claudia González	S. Multieport	[Firma]	claudia.gonzalez@multieport.cl
11	Marcos Alcayaga	Sernapesca	[Firma]	marcos.alcayaga@sernapecsa.cl
12	Carla Rosales	UACH	[Firma]	carla.rosales@uach.cl
13	Yoanna Essler	U. Valparaíso	[Firma]	yoanna.essler@uv.cl
14	Pauel Torres	U. Valparaíso	[Firma]	pauel.torres@uv.cl
15	David Tapia	UV	[Firma]	David.Tapia@uv.cl
16	Juan Carlos Espinoza	UV	[Firma]	Juan.Espinoza@uv.cl
17				
18				

Figura 28. Lista de participantes al Taller Proyecto FIPA 2014-06.

Conclusiones Taller de Difusión

Las notas que se presentan aquí, se derivan de la mesa redonda de preguntas realizada durante el Taller con la participación de los asistentes al evento.

- Quedó en evidencia la falta de información entregada por las empresas a las que se les aplicó la encuesta. Esta información fue utilizada para construir la base de datos y hacer las pruebas estadísticas en la determinación de factores de riesgo de la enfermedad. De esto se desprende que para poder llegar a resultados más significativos en cuanto a determinar factores de riesgo y protectivos para el IPN, es importante disponer de mayor información junto con las bases de datos de Sernapesca.
- Respecto a las técnicas de diagnóstico utilizadas, la que mostró mayor sensibilidad fue el PCR anidado, por lo que se destacó como la técnica que mejor definió la presencia del virus i.e., *gold standard*, en este trabajo y permitió identificar salmones portadores del virus IPN.
- Dentro de los factores protectivos para la presentación de la enfermedad, se destacó el uso de la vacuna Alphaject y la realización de la limpieza y desinfección por parte de la

misma empresa (en vez de una empresa externa) en los centros de cultivo de agua dulce.

- Se planteó que, para futuros trabajos sería importante definir el porcentaje de mortalidad de un brote en terreno, que es considerado como un problema para el área productiva en agua dulce y agua de mar, el cual difiere de la definición estrictamente epidemiológica, en cada una de éstas fases de cultivo.
- Se recalca la importancia de la detección de peces portadores asintomáticos, ya que las medidas de manejo actuales no impiden que éstos, se unan a la población de peces no infectados. Esta es una problemática que se debe, en parte, a la dificultad de detectar virus presentes en títulos bajos utilizando solo una técnica de diagnóstico. Por otro lado, se destaca también que los peces sobrevivientes a un brote pueden afectar a la producción más que la propia mortalidad del brote, ya que posteriormente estos se rezagan, tienen baja tasa de conversión y finalmente solo significan un gasto innecesario para la empresa.
- Se dejó abierta la posibilidad de futuras investigaciones sobre técnicas de diagnóstico que sean lo suficientemente sensibles y específicas para la detección de bajas concentraciones de virus en peces portadores. Para esto, es importante que se llegue a un consenso entre las técnicas y protocolos utilizadas por los laboratorios de diagnóstico y se estandarice la detección del IPN en Chile.
- El tema de peces con QTL para la resistencia a IPN fue conversado ampliamente. Entre sus características se destacó que otorgan mayor resistencia al virus pero no inmunidad, ya que se ha demostrado que el virus puede replicarse en peces con QTL. Además, se señaló también que escasea información de su efectividad en trucha arcoíris, o frente a virus de diversos genogrupos, ya que solo existe información para salmón del Atlántico infectado con virus del genogrupo 5.
- Finalmente, se destacó el hecho de que la investigación del Laboratorio de Virología de la Universidad de Valparaíso es respaldada por publicaciones científicas de carácter ISI, las cuales fueron compartidas con todos los asistentes al Taller. En la Figura 29 se muestra el registro fotográfico del Taller.



Figura 29. Registro Fotográfico del Taller.

## CONCLUSIONES

Se concluye para este informe final en la ejecución del proyecto que:

### **Objetivo 1:**

- Se logró un avance del 100% en la Revisión bibliográfica, la cual se dividió en 4 temas principales: Enfermedad de la Necrosis Pancreática Infecciosa, Agente etiológico, Técnicas de diagnóstico, y Epidemiología y control
- De la revisión bibliográfica se concluye que, los principales avances que se han realizado en los últimos años de investigación sobre IPNV, tienen relación con la caracterización molecular y filogenia de aislados del IPNV, el desarrollo y evaluación de nuevas técnicas de diagnóstico para la detección y genotipificación del virus, la virulencia del virus y posibles marcadores moleculares para determinarla, la interacción patógeno-hospedador y la respuesta inmune presentada frente a la infección con el virus, los factores de riesgo que pueden influenciar la aparición de brotes de la enfermedad, y la heredabilidad y descubrimiento de marcadores genómicos para la resistencia a ésta. No obstante, aún falta mucho que investigar en estas áreas, especialmente en lo que se refiere a marcadores moleculares de virulencia, factores de riesgo y resistencia genética a la enfermedad.

### **Objetivo 2:**

- Se realizaron 26 muestreos en terreno, de los cuales 18 corresponden a pisciculturas y 8 a centros de mar, distribuidos entre la Región del Bío-Bío y la de Magallanes. De estos muestreos, 20 son de la especie *S. salar*, 3 de *O. kisutch* y 3 de *O. mykiss*; 10 de ellos corresponden a alevines, 12 a smolt y 4 a peces adultos.
- De las 53 muestras analizadas 50 fueron positivas para IPNV mediante al menos una de las técnicas de diagnóstico utilizadas (i.e., aislamiento en cultivo celular, IFAT, qRT-PCR, y PCR anidado).
- Se obtuvieron aislados de virus IPNV a partir de todos los centros analizados. Conteniendo el cepario 50 aislados de IPNV, de los cuales 48 pudieron ser genotipificados mediante alguna de las técnicas utilizadas para su secuenciación.

- Se determinó, en base a la secuencia de los virus obtenidos que, la mayoría pertenecen al genogrupo 5, o tipo Europeo, los que corresponden a 40 virus pertenecientes a 20 centros distribuidos desde la región de La Araucanía a la de Magallanes. En menor proporción está presente el genogrupo 1, o tipo norteamericano, correspondiendo a 12 virus, muestreados desde 6 centros en las regiones Bío-Bío, Los Ríos y Los Lagos.
- Se observó una relación hospedador-específica en los genogrupos identificados, ya que todos los virus obtenidos de *Salmo salar*, pertenecen al genogrupo 5 y los virus obtenidos de *O. kisutch* y *O. mykiss* pertenecen al genogrupo 1.
- Se encontró que al examinar la relación filogenética de un fragmento de 1180 pb de la proteína VP2 los virus del genogrupo 1 se agrupan en un genotipo de virus chilenos, separados de los virus de referencia que provienen de Norteamérica,. Asimismo, al analizar el segmento A completo para 15 virus se presentó la misma agrupación con mayor significancia, sin embargo, no ocurrió lo mismo al examinar el segmento B completo de estos virus.
- Al examinar los segmentos A y B de 15 aislados, no se encontraron reordenantes del virus, es decir el análisis filogenético de los segmentos A y B clasificó a los virus en los mismos genogrupos 5 o 1 según correspondía.
- Se identificaron aminoácidos caracterizados como marcadores de alta virulencia en 26 aislados del genogrupo 5 y de moderada virulencia en todos los virus del genogrupo 1. No obstante, solo se observó una relación moderada entre estos marcadores de virulencia y la mortalidad observada en los centros muestreados.
- Se desprende de los resultados que las muestras con código ANEP, IFGF, FHON, ASKR, RPCO, IPFA2°, PPVD, PMLC, GMTS, IGFH, TAMB, CKBG, SFAA, CHMD y PLNO constituyeron infecciones agudas por IPNV. Por otro lado, las muestras con código CMOO, PRBE y PERA presentaron un cuadro subagudo de infección, mientras que JGHL, IPFA, EKLT y RTTX presentaron un cuadro crónico. Las muestras de código QHPF, SFJL y HYBS mostraron evidencia de provenir de peces portadores, sin embargo, sin embargo presentaron un cuadro inespecífico de infección.

- En la mayoría de los casos, la signología clínica se relacionó con los resultados obtenidos con las técnicas de diagnóstico. Peces con escasa signología para IPN, presentaron una carga viral baja, asociándose a casos de infección crónica o persistente.

### **Objetivo 3:**

- Del análisis de los factores se determinó que la vacuna Alphaject posee un efecto protector en relación a las otras vacunas así como las estaciones de invierno y verano en relación a otoño y primavera.
- Como factor de alto riesgo de IPN fue la presentación previa al brote de otros eventos de enfermedad.
- Se determinó que en los centros de agua dulce que realizan su propia limpieza y desinfección es protector en relación a que la actividad la realice una empresa externa.
- En este estudio en relación a centros de mar, no se logró identificar condiciones y actividades asociadas a la aparición de los brotes, una de las probables causas podría deberse a la baja prevalencia de IPN en mar durante el periodo de la investigación.

### **Taller de difusión:**

- Se realizó con éxito el taller de difusión de resultados del proyecto, con la asistencia de representantes de SERNAPESCA, SUBPESCA y de diversas empresas asociadas con la industria de la salmonicultura.
- Dentro de las conclusiones y recomendaciones desprendidas de la mesa redonda de preguntas realizada al finalizar el taller, destacan: la necesidad de obtener mayor información desde las empresas para realizar nuevos estudios epidemiológicos; la importancia de la detección de peces portadores asintomáticos, así como contar con nuevos métodos de diagnóstico más sensibles; y el conocer en mayor profundidad el impacto de peces con QTL para la resistencia a IPN.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ariel E, Olesen NJ (2001). Finfish in aquaculture and their diseases A retrospective view on the European Community.
- Bang Jensen B, Kristoffersen AB (2015). Risk factors for outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) and associated mortality in Norwegian salmonid farming. *Dis Aquat Organ* 114(3): 177-187.
- Blake, S.L., W.B. Schill, P.E. McAllister, M.K. Lee, J.T. Singer & B.L. Nicholson. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by pcr assay. *J. Clin. Microbiol.*, 33(4): 835-839.
- Blake S, Ma JY, Caporale DA, Jairath S, Nicholson BL (2001) Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment a cDNA. *Dis Aquat Organ* 45:89-102
- Bootland LM, Dobos P, Stevenson RM (1986) Experimental induction of the carrier state in yearling brook trout: A model challenge protocol for ipnv immunization. *Vet Immunol Immunopathol* 12:365-372
- Bowers RM, Dhar AK (2011) Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an rna virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 25:60-64
- Bowers RM, Lapatra SE, Dhar AK (2008) Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *Journal of Virological Methods* 147:226-234
- Bruslind LD, Reno PW (2000) Virulence comparison of three buhl-subtype isolates of infectious pancreatic necrosis virus in brook trout fry. *Journal of Aquatic Animal Health (OIE)* 12:301-315
- Calleja F, Godoy MG, Cárcamo JG, Bandín I and others (2012) Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time rt-pcr) assays with universal probe library (upl) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in chile. *Journal of Virological Methods* 183:80-85
- Dobos P (1995) The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (ipnv). *Annual Review of Fish Diseases* 5:25-54
- Eissler Y, Pavlov MS, Conejeros P, Espinoza JC, Kuznar J (2011) Detection and quantification of chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time rt-pcr assays using segment b as a target. *Lat Am J Aquat Res* 39:9
- Espinoza E, Fariás G, Soler M, Kuznar J (1985) Identity between infectious pancreatic necrosis virus vr-299 and a chilean isolate. *Intervirology* 24:58-60
- Espinoza J, Kuznar J (2002) Rapid simultaneous detection and quantification of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Journal of Virological Methods* 105: 81-85.
- Jarp J, Gjevre AG, Olsen AB, Bruheim T (1994) Risk-factors for furunculosis, infectious pancreatic necrosis and mortality in post-smolt of atlantic salmon, salmo-salar l. *Journal of Fish Diseases* 18:67-78
- McAllister PE, Reyes X (1984) Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, salmo gairdneri richardson, imported into chile. *Journal of Fish Diseases* 7:4
- McColl KA, Davies KR, Young JG, Crane M (2009) Aquatic brinavirus infections of finfish. In: Australia and new zealand standard diagnostic procedure. Sub-Committee on Animal Health Laboratory Standards

- Munro ES, Midtlyng PJ (2011) Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: Woo PTK, Bruno DW (eds) Fish diseases and disorders volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. CABI, p 1-65
- Murray A, Leschen W, Kilburn R, Raynard R (2004) A case-control study for the identification of risk factors behind clinical outbreaks of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN). Fisheries Research Services Internal Report No 06/04.
- Murray A (2006). Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Scottish salmon (*Salmo salar* L.) farms. Preventive Veterinary Medicine 76(1-2): 97-108.
- Mutoloki S, Evensen O (2011) Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of infectious pancreatic necrosis virus point towards a common origin. Journal of General Virology 92:1721-1726
- Moore LJ, T. Somamoto, K.K. Liea, J.M. Dijkstrab, I. Hordvika (2005) Characterisation of salmon and trout CD8 $\alpha$  and CD8 $\beta$ . Molecular Immunology 42 (2005) 1225–1234
- OIE (2006) Manual of diagnostic tests for aquatic animals. In: Health WOFA (ed), Paris, p 469 pp.
- Ørpetveit I, Mikalsen AB, Sindre H, Evensen Ø, Dannevig BH, Midtlyng PJ (2010) Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in subclinically infected Atlantic Salmon by virus isolation in cell culture or real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of sample preservation and storage. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 22: 886.
- Roberts RJ, Pearson MD (2005) Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 28:383-390
- Rodriguez Saint-Jean S, Borrego JJ, Perez-Prieto SI (2001) Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish. Journal of Virological Methods 97:23–31.
- Santi N, Song H, Vakharia VN, Evensen O (2005) Infectious pancreatic necrosis virus vp5 is dispensable for virulence and persistence. Journal of Virology 79:9206-9216
- Santi N, Vakharia VN, Evensen Ø (2004) Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 322:31-40
- SERNAPESCA (2012) Programa sanitario general Laboratorios de diagnóstico de enfermedades de animales acuáticos. Norma Técnica n°1: Procedimientos para el muestreo de animales acuáticos. LABD/NT1/diciembre 2012 In: SERNAPESCA (ed), p 26
- SERNAPESCA (2016a). Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2015. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura: 1-35.
- SERNAPESCA (2016b). Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos 1er semestre 2016. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura: 1-33.
- Song H, Santi N, Evensen O, Vakharia VN (2005) Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. Journal of Virology 79:10289-10299
- Kumar S, Stecher G, & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Mol. Biol. Evol., 33(7):1870–1874.
- Tapia D, Eissler Y, Torres P, Jorquera E, Espinoza JC, Kuznar J (2015) Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. Diseases of Aquatic Organisms, 116: 173-184.
- Tapia D, Eissler Y, Espinoza JC, Kuznar J Inter laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile Enviado Electronic Journal of Biotechnology.

TechnoPress, SalmonChile (eds) (2003) La acuicultura en Chile, Vol, Santiago, Chile  
Williams K, Blake S, Sweeney A, Singer JT, Nicholson BL (1999) Multiplex reverse transcriptase pcr assay for simultaneous detection of three fish viruses. J Clin Microbiol 37:4139-4141

## ANEXOS

### Anexo 1: Personal participante por actividad y objetivo específico

De acuerdo a la carta Gantt, se presenta en la Tabla 23. el personal participante del proyecto por objetivo y tiempo asignado, seguido se especifican las funciones de cada uno por actividad.

En este informe se incluyen, además, las horas comprometidas por los inspectores de SERNAPESCA, que actúan como ministros de fe, en la actividad relacionada con la de toma de muestra de los peces y en el llenado de las encuestas. No obstante, éstos no fueron considerados en la *Valorización del cuadro de personal/tiempo/actividad*, en la Oferta Económica de la presentación del Proyecto, ya que no están considerados dentro del Equipo de Trabajo del Ejecutor. Asimismo, no fueron considerados en el Presupuesto de Honorarios de Profesionales y Técnicos.

Tabla 23.: Personal participante del proyecto por objetivo y tiempo asignado

	16-ene	feb	mar	ab
<b>Objetivo 1</b>				
YOANNA EISSLER	10	0	2	2
JUAN CARLOS ESPINOZA	10	0	2	2
CARLA ROSENFELD	5	0	1	1
DAVID TAPIA	12	0	4	4
PAMELA TORRES	12	0	4	4
JUAN KUZNAR	2	0	1	0
<b>Objetivo 2</b>				
YOANNA EISSLER	10	0	2	2
JUAN CARLOS ESPINOZA	10	0	2	2
CARLA ROSENFELD	5	0	1	1
DAVID TAPIA	12	0	4	4
PAMELA TORRES	12	0	4	4
JUAN KUZNAR	2	0	1	0
INSPECTORES SERNAPESCA	0	0	0	0
<b>Objetivo 3</b>				
YOANNA EISSLER	10	8	2	1
JUAN CARLOS ESPINOZA	10	2	2	0
CARLA ROSENFELD	20	10	5	5
DAVID TAPIA	12	2	4	0
PAMELA TORRES	12	0	4	0
JUAN KUZNAR	2	0	1	0
INSPECTORES SERNAPESCA	2	2	0	0
<b>Total</b>				
YOANNA EISSLER	30	8	6	5
JUAN CARLOS ESPINOZA	30	2	6	4
CARLA ROSENFELD	30	10	7	7
DAVID TAPIA	36	2	12	8
PAMELA TORRES	36	0	12	8
JUAN KUZNAR	6	0	3	0
INSPECTORES SERNAPESCA	2	2	0	0

## Objetivo 1

Actividad: “Revisión de la información bibliográfica disponible, tanto nacional como internacional, de la Necrosis Pancreática Infecciosa”. Ésta revisión bibliográfica compromete una recopilación de la literatura asociada a la investigación del virus IPN, en revistas científicas indexadas y no indexadas. En esta actividad participaron: Yoanna Eissler, Carla Rosenfeld, David Tapia, Pamela Torres y Juan Carlos Espinoza.

## Objetivo 2

El objetivo 2 presenta varias actividades relacionadas con la participación de las empresas salmonicultoras, tanto para la obtención de las muestras de órganos de peces que presenten la enfermedad, como la de la aplicación de las encuestas, casos y control.

### Actividades

**Concretar convenios Empresas Salmoneras:** Para esta actividad se realizaron dos reuniones, el 1 de julio del 2015, ya reportada en el primer informe del proyecto con la participación de la directora del proyecto Yoanna Eissler y Carla Rosenfeld. La segunda instancia de reuniones (27-28 enero 2016) con empresas, reportada en el informe 2, tuvo la participación del director alterno del proyecto Juan Carlos Espinoza y David Tapia.

**Muestreo en terreno.** Para la toma de muestras en terreno y aplicación de las encuestas epidemiológicas se cuenta con el apoyo de los Inspectores de Sernapesca, no obstante, y para apoyar esta tarea se contrataron los servicios de la empresa Aquagestión. La coordinación de la toma de muestra, envío de material para la obtención de muestras y recepción de las mismas, fue responsabilidad de David Tapia y Juan Carlos Espinoza.

La información semanal de mortalidad asociada al virus IPN, proveniente de Sernapesca fue entregada a Yoanna Eissler, quien se encargó de distribuirla al grupo de trabajo.

**Evaluar avance muestreos en terreno:** Semanalmente el grupo de trabajo de la Universidad de Valparaíso (UV) (i.e., Yoanna Eissler, David Tapia, Pamela Torres y Juan Carlos Espinoza) se reunió para realizar esta evaluación y posteriormente comunicarla a Carla Rosenfeld.

**Caracterización microbiológica, epidemiológica y molecular de los aislados virales.** En esta actividad, centrada en el trabajo de laboratorio, participaron los siguientes investigadores: Yoanna Eissler, David Tapia, Pamela Torres, Juan Carlos Espinoza y se contrató los servicios de la empresa Pathovet para los estudios de histopatología de los órganos de peces infectados por el virus IPN. Dentro de esta actividad se realizó lo siguiente: mantención de líneas celulares susceptibles de ser infectadas por el virus, caracterización del efecto citopático producido tras la infección, obtención de virus aislados de muestras de campo, titulación de los aislados virales, inmunofluorescencia, qRT-PCR y PCR convencional. Además de la mantención de un completo registro de los virus que, posteriormente, son almacenados a -80°C y que corresponde al cepario.

**Implementación y mantención de un cepario de virus IPN.** Como Laboratorio Nacional de Referencia, esta actividad es permanente y es muy importante para observar la evolución molecular del virus IPN en nuestro país. Gracias a la mantención de este cepario se han realizado Ring Test entre los laboratorios de la red, para el control de calidad de los métodos de detección para virus IPN, con muestras de virus provenientes de campo. David Tapia es el responsable de esta actividad en este proyecto y Juan Carlos Espinoza es el responsable dentro del Laboratorio de Referencia.

**Secuenciación y análisis bioinformático.** La preparación de las muestras para ser secuenciadas es realizada por Pamela Torres y el análisis bioinformático de las secuencias fue responsabilidad de Pamela Torres, David Tapia y Yoanna Eissler.

### **Objetivo 3**

Este objetivo aborda la epidemiología del virus IPN. Presenta las siguientes actividades.

**Diseño y validación de encuestas epidemiológicas.** La actividad contó con la participación principal de Carla Rosenfeld en la elaboración y validación de las encuestas. Además el equipo de trabajo de la UV (i.e., Yoanna Eissler, David Tapia, Pamela Torres, Juan Carlos Espinoza y Juan Kuznar) realizaron aportes en relación al contenido y validación de las encuestas epidemiológicas. En concreto, se revisaron las encuestas en la reunión del 6 de julio, 2015 con los inspectores de Sernapesca en la UV y en la presentación realizada el 7 de julio, 2015 ante todos los inspectores y el Departamento de Salud Animal de Sernapesca, reuniones reportadas en el primer informe del proyecto. Las encuestas además fueron validadas en la reunión del 1 de julio del 2015 con miembros activos de la industria salmonicultora.

**Recepción encuestas epidemiológicas e información de casos según semana epidemiológica (Sernapesca) y construcción base de datos:** La actividad de recepción e información de los muestreos y encuestas epidemiológicas está a cargo de David Tapia y Yoanna Eissler, la recepción de la información semanal entregada por Sernapesca está a cargo de Yoanna Eissler y la construcción de la base de datos a cargo de Carla Rosenfeld.

**Descripción y análisis epidemiológicos de las encuestas epidemiológicas aplicadas.**

**Análisis de los datos para la identificación de los factores de riesgo y protectivos para la presentación de la enfermedad.**

Estas dos últimas actividades son responsabilidad de Carla Rosenfeld, aun cuando la recolección, orden y traspaso de los datos a Carla Rosenfeld, es responsabilidad de Yoanna Eissler y David Tapia.

**Otras actividades relevantes del proyecto asociadas a los Objetivos 1, 2 y 3.**

**Reuniones de coordinación técnica y de estado de avance del proyecto:** Se realizaron 4 reuniones en total (i.e., 08/05/15, 28/05/15, 27/11/15 y 13/01/16) con la contraparte técnica de Subpesca y Sernapesca y el FIPA. En dos de estas reuniones participó Carla Rosenfeld, en

una Juan Kuznar y en las cuatro, Yoanna Eissler, David Tapia, Pamela Torres y Juan Carlos Espinoza.

**Entrega primer informe de avance:** En esta actividad participó todo el equipo de trabajo.

**Entrega segundo informe de avance:** En esta actividad participó todo el equipo de trabajo.

**Entrega pre-informe final:** En esta actividad participó todo el equipo de trabajo

**Entrega informe final:** En esta actividad participó todo el equipo de trabajo

**Elaboración material fotográfico que dará cuenta de las principales actividades del proyecto:** esta actividad se comparte dentro del equipo, sin embargo, el responsable de la compilación, el orden y la presentación del material es Juan Carlos Espinoza.

**Elaboración resumen del proyecto en idioma inglés:** El equipo completo contribuye a la elaboración y la responsable de la actividad es Yoanna Eissler.

**Taller de difusión:** La elaboración del material a exponer en el taller de difusión es responsabilidad de todo el equipo, la responsable de exponer los resultados de los objetivos 1 y 2 es Yoanna Eissler y la responsable de exponer los resultados del objetivo 3 es Carla Rosenfeld.

**Elaboración de conclusiones y recomendaciones provenientes del taller de difusión:** El equipo completo contribuye a la elaboración y la responsable de la actividad es Yoanna Eissler.

**Elaboración publicación científica:** El equipo es responsable de la elaboración de una publicación científica, independiente de que pueda generarse más de una publicación utilizando resultados parciales del proyecto como se adjunta en este informe.

## Anexo 2: Ficha de Muestreo

### FICHA DE MUESTREO CENTRO CON BROTE IPN

<b>Nombre y Código centro:</b>					
<b>Fecha del muestreo:</b>					
<b>Código o clave identificación de muestras:</b>					
<b>Nombre médico Veterinario que realiza el muestreo:</b>					
<b>Sernapesca:</b>					
<b>Empresa:</b>					
<b>Ubicación geográfica del Centro:</b>		Tierra	Lago	Río	Mar
<b>Piscicultura :</b>	Abierta	Recirculación		Mixta	
<b>Especie:</b>	Salmón atlántico	Trucha arcoíris	Salmón Coho		
<b>Estado de los peces :</b>	Mortalidad fresca	Moribundos	Orillados	Otro	
<b>Estado de desarrollo:</b>	Alevín	Smolt	Adulto		
<b>Tamaño promedio:</b>					
<b>Peso promedio:</b>					
<b>Densidad de cultivo promedio:</b>					
<b>Temperatura del agua (°C):</b>					
<b>Oxígeno disuelto (mg/L o mL/L):</b>					
<b>Diagnóstico brote IPN (indicar diagnóstico clínico o laboratorio)</b>					
<b>Clínico:</b>			<b>fecha:</b>		
<b>Laboratorio:</b>		<b>Técnica:</b>		<b>fecha:</b>	
<b>Fecha Inicio brote:</b>					
<b>Fecha Término brote:</b>					
<b>Porcentaje mortalidad asociada al brote:</b>	Diaria:	Semanal:	Acumulada al Brote:		
<b>Observaciones:</b>					

**Hallazgos de la necropsia por grupo muestreado** (indicar en cada cuadro el número de individuos con lesión/ número total analizados)

<b>Piel</b>		Oscurecimiento		↑ Despigmantación		Lesiones ulcerativas		Estructuras fúngicas		
		↑ Abscesos		Hemorragias		Petequias		Otros		
<b>Branquias</b>		Pálidas		Hemorrágicas		↑ Otros				
<b>Globo ocular</b>		Exoftalmia		Hemorragias periorculares		Opacidad corneal		Otros		
<b>Ano</b>		Hemorrágico		Protruido		Otros				
<b>Aletas</b>		Raídas		Hemorrágicas		Otros				
<b>Estado nutricional (Grasa visceral)</b>		Buena (Abundante)		Regular (Moderada)		Malo (Escasa)				
<b>Hígado</b>		Pálido		Congestivo		Color amarillo		Hepatomegalia		Nódulos
<b>Grasa Visceral</b>		Hemorrágica		Congestiva		Otros				
<b>Intestino</b>		Paredes congestivas		Paredes hemorrágicas		Enteritis catarral		Otros		
<b>Ciegos Pilóricos</b>		Congestivos		Hemorrágicos		Petequias		Otros		
<b>Bazo</b>		Esplenomegalia		Inflamación		Congestión		Pálido		Nódulos
<b>Sistema digestivo</b>		Mucosas hemorrágicas		Con contenido alimenticio		Con contenido líquido/mucoso		Sin contenido		
<b>Cavidad abdominal</b>		Ascitis		Sangre		Adherencias (E.S. 0 - 1 - 2 -3)		Otros		
<b>Riñón</b>		Renomegalia (Leve – Moderada – Severa)				Pálido		Con nódulos		
<b>Cerebro</b>		Hemorrágico		↑ Congestivo		Otros				
<b>Musculatura</b>		Hemorragias		Otros						
<b>Corazón</b>		Pálido		Hidropericardio		Pseudomembranas		Otros		
<b>Vejiga Natatoria</b>		Hemorrágica		Con contenido líquido		Otros				

**Proyecto IPNV**  
**Formulario de envío de muestras a laboratorio de verificación**

*Marcar con una "X" las casillas cuando corresponda*

			Fecha Muestreo		
Información del Envío de Muestras	Hora de Despacho		Fecha Despacho		
	Empresa de transporte			Nº de Orden	
Información de las Muestras Tomadas	Tipo de Muestra	Órganos		Pez Completo	
	Nº de Peces Muestreados		Nº de Contramuestras		
	Nº de Pooles Conformados		Nº de Análisis Requeridos		
			Examen Requerido		

Nº	Rotulo de Tubo	Nº de Jaula o Estanque	Muestra	Preservante MC/ Formalina	Especie	Órgano (s)	Código de muestro
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							

## Anexo 3: Encuestas Epidemiológicas Control

### CENTROS CONTROLES AGUA DULCE.

Encuesta epidemiológica en centro de cultivo de salmones sin de brotes de IPNV, Agua dulce.

Nombre centro:		Código:		Fecha:	
Med. Vet. Inspector:		Nombre y cargo encuestado:		N° trabajadores _____	

<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 _____								
f) Especies: S. atlántico _____ T. Arco Iris _____ S. coho _____								
g) N° de Unidades Epidemiológicas: _____ ¿Cuáles? _____								
h) 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.								
<b>II.- Técnicas y métodos de desinfección de afluentes y efluentes y sus modos de control.</b>								
1.- Desinfección de Afluente Si _____ No _____ 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?				
Observación:								
<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				
1								
2								
3								
4								
5								
3.-Origen de las ovas (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 del laboratorio informante: _____								
<b>5.-SALA/S DEL CENTRO:</b> N° total _____ Indique que salas se les realizo las siguientes actividades:								
	N° estanques	Ingresos año	N° peces	Especie	Pesos prom.	N° salidas/sala año	N° manejos grupos peces	N° de estanques limpieza/hig. previo ingreso de peces últ. año
SALA1								
SALA2								
SALA3								
SALA4								
SALA5								
SALA6								
SALA7								

Observación							
<b>6.-Descansos y limpieza y desinfección</b>							
a)Días de descanso previo al ingreso de los peces _____							
b)La limpieza e hig. de estanques la realiza: Propio centro ___ Emp. externa ___ Nombre empresa _____							
c)Al finalizar la etapa de producción se desarma la tubería para realizar la limpieza/hig. Si ___ No ___							
d)La tubería de los estanques poseen codo/s que generan acumulación de agua cuando éstos están vacíos Si ___ No ___							
e)Al finalizar la etapa de producción realiza: Renovación del biofiltro ___ Limpieza de biofiltro ___ No aplica ___							
<b>IV.-Condiciones ambientales:</b> indique los eventos durante los 3 meses antes de la visita y/ o llenado de la encuesta							
Fecha	Temporales	Presencia de aguas turbias			Bajas de oxígeno	%Mort. acumulada	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
<b>V.- Información del centro antes y durante de la visita y/ o llenado de la encuesta:</b>							
Sala/estanque/lote antes de la visita y/ o llenado de la encuesta:							
Fecha de la visita	Sala	Id. lote	Id. Estanque	Temperatura del agua	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 IPN: n° veces _____ años _____ meses _____ peso prom. Aprox.							
<b>VI.-Características de los estanques o balsa jaula:</b>							
Característica				Antecedentes			
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 de la visita y/ o llenado de la encuesta? Si ___ No ___ ¿Cuál? _____							
<b>VII.-Haga un dibujo o layout de los estanques o balsas jaulas identificándolos.</b>							





Antecedentes previos de IPN en agua dulce Si ___ No ___							
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
Observación							
<b>V.- Información del centro:</b> N° jaulas ___ ( en lo posible base de datos)							
Información jaulas al momento de la visita o llenado encuesta Fecha visita _____							
Identificación del batch	Identificación de las jaulas	T° agua		Peso prom. Peces	Especies	Estado de desarrollo	
		Prom. ___ min. ___ max. ___					
		Prom. ___ min. ___ max. ___					
		Prom. ___ min. ___ max. ___					
		Prom. ___ min. ___ max. ___					
		Prom. ___ min. ___ max. ___					
El centro ha tenido brote/s de IPN en Año/s o meses anteriores: n° veces ___ años _____ meses _____ peso prom. Aprox. _____							
<b>VI.-Características de las balsa jaula:</b>							
				Indique			
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 en el último tiempo? Si ___ No ___ ¿Cuál? _____							
<b>VII.-Haga un dibujo o layout de las balsas jaulas identificándolas.</b>							
<b>VIII.-Antecedentes de los centros de agua dulce de procedencia: Ingresos</b>							
Código del centro de procedencia	Especie	Id. del lote/batch	N° peces	Antecedentes de brote/s de IPN en etapa de producción anterior			
				Si ___ No ___			
				Si ___ No ___			
				Si ___ No ___			
				Si ___ No ___			
				Si ___ No ___			
				Si ___ No ___			
<b>IX.-Vacunaciones</b>							



## Anexo 4: Encuestas Epidemiológicas Caso

### CENTROS CASOS AGUA DULCE.

Encuesta epidemiológica de centro de cultivo de salmones con brote/s de IPNy, en agua dulce.

Nombre centro:		Código:		Fecha:	
Med. Vet. Inspector:		Nombre y cargo encuestado:		N° trabajadores _____	

<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 _____					
e) Especie/s: S. atlántico _____ T. Arco Iris _____ S. coho _____		d) Reproducción _____		e) Engorda _____					
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.									
<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 IPN _____ Total batch con reprod. con IPN _____									
<b>5.- SALA/S DEL CENTRO: N° total _____ Indique que salas se les realizó las siguientes actividades:</b>									
	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
SALA1									
SALA2									
SALA3									
SALA4									
SALA5									
SALA6									
SALA7									
SALA8									

Observaciones:

**6.-Descansos y limpieza y desinfección**

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. Si \_\_\_ No \_\_\_

d)La tubería de los estanques poseen codo/s que generan acumulación de agua cuando éstos están vacíos Si \_\_\_ No \_\_\_

e)Al finalizar la etapa de producción realiza: Renovación del biofiltro \_\_\_\_\_ Limpieza de biofiltro \_\_\_\_\_ No aplica \_\_\_\_\_

**IV.-Condiciones ambientales: ( indique los eventos en los últimos 3 meses antes del brote)**

Fecha	Temporales antes del brote	Presencia de aguas turbias	Bajas de oxígeno	%Mort. acumulada
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				

**V.- Información de los casos de brotes:** N° estanques en brote \_\_\_ ( en lo posible base de datos)

Sala/estanque/lote con brote presenta mortalidades por causa de IPN superior a 0,02% diario o un 2% acumulado en un n ≤ 7 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 IPN: n° veces \_\_\_\_\_ años \_\_\_\_\_ meses \_\_\_\_\_ peso prom. Aprox.

**VI.-Características de los estanques o balsa jaula:**

	Antecedentes de estanques Con brote IPN	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? Si ___ No ___ ¿Cuál? _____		

**VII.-Haga un dibujo o layout de los estanques o balsas jaulas identificándolos e indicando aquellos con brote.**



**CENTROS CASOS AGUA DE MAR.**

**Encuesta epidemiológica en centro de cultivo de salmones con brote de IPNy, Agua 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>n° trabajadores:</b>	
<b>I.- Antecedentes Generales.</b>					
1.-Actividad(es) del centro de cultivo (marque con una X una o más alternativas)					
a) Engorda____ b) Reproductores____ c)Rec. reproductores____ d) Especie/s: S. atlántico ____ T. Arco Iris____ S. coho ____					
Descripción de sistemas complejos.					
Densidad de siembra____ Núm. peces por jaula n°/m <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(mallas)____		b) principal del centro____			
c)Traslado para la siembra se realiza por :Camión ____ Barcos ____ Ambos____ indique si es de uso: exclusivo____ Compartido____					
<b>Mallas (marque con una X una o más alternativas):</b>					
1.-Cracterísticas de las mallas: a) Tipo de malla: Cobre____ Nylon____ Poliéster____ b) Impregnada Si ____ No ____					
c)Por lavado in situ____ frecuencia lavado____ d) Lavado en taller____ frecuencia lavado____ e) Empresa que lava____					
Observaciones:					
2.-Traslado de las mallas para la siembra se realiza por : Camión ____ Barcos ____ Ambos____ 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 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 Si ____ 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: (Brote: Presenta mortalidades durante el ciclo productivo por causa de IPN superior a 0,02 %).</b>					
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:					

3.-Reproductores screening fue hecho en: Pooles _____ Individual _____ con Ct PCR _____ sin Ct PCR _____								
Nombre del laboratorio informante _____								
4.-Total de batch con reproductores _____ n° reprod. Con IPN _____ Total batch con reprod. con IPN _____								
5.-Antecedentes previos de los peces con IPN en agua dulce Si _____ 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								
V.- Información de los casos de brotes: N° jaulas en brote _____ ( en lo posible base de datos)								
Jaula/batch con brote presenta mortalidades por causa de IPN superior a 0,02% diario o un 2% acumulado en un n ≤ 7 días								
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 IPN: n° veces _____ años _____ meses _____ peso prom. Aprox.								
VI.-Características de las balsa jaula:								
			Con brote IPN			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? Si _____ No _____ ¿Cuál? _____								
VII.-Haga un dibujo o layout de las balsas jaulas identificándolas e indicando aquellas con brote.								

VIII.-Antecedentes de los centros de agua dulce de procedencia: Ingresos					
Código del centro de procedencia	Especie	Id. del lote/batch	N° peces	Antecedentes de brote/s de IPN en etapa de producción anterior.	
1				Si ___	No ___
2				Si ___	No ___
3				Si ___	No ___
4				Si ___	No ___
5				Si ___	No ___
6				Si ___	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 Si ___ ¿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 al brote de IPN: (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 de IPN (daño mecánico).						
Indique otras causas que produjeron daño mecánico previos al brote de IPN _____						
Baja oxígeno acumulados previo al brote de IPN						
Ataque de pájaros acumulados previo al brote de IPN						
Ataque de lobos acumulados previo al brote de IPN						
Número total eventos estresantes acumulados previo al brote de IPN						

## **Anexo 5: Material fotográfico recopilado durante la ejecución del proyecto**

### *Reuniones*

Primera reunión de coordinación. Lugar: Oficinas de SUBPESCA

Fecha: 8 de Mayo de 2015. Asisten a la reunión: Maureen Alcayaga y Michell Dapremontt por parte de SUBPESCA, Karen Montecinos de SERNAPESCA, Yoanna Eissler, David Tapia, Pamela Torres, Carla Rosenfeld y Juan Carlos Espinoza como parte de los consultores del adjudicado proyecto.



Reunión de trabajo en el Laboratorio de Referencia de la Universidad de Valparaíso con Inspectores de SERNAPESCA. Lunes 6 de Julio de 2015



---

Reunión Presentación del Proyecto en encuentro de Inspectores de SERNAPESCA. 7 de Julio de 2015. Expone Dra. Yoanna Eissler





Reuniones de Coordinación Proyecto FIPA 2014-60 en la ciudad Puerto Montt (27 y 28 de Enero de 2016). David Tapia y Juan Carlos Espinoza



Reunión con Médicos Veterinarios de Aquagestión



Reunión con Manuel Salas de Aquagestión



Reunión con Pablo Mazo, Ventisqueros



Reunión con Mauricio Cristi, Camanchaca



Reunión con Mauricio Cristi (Camanchaca) y Manuel Salas (Aquagestión).



Reunión con Daniel Quiroz, Salmones Cupquelán

## Recepción y procesamiento de muestras

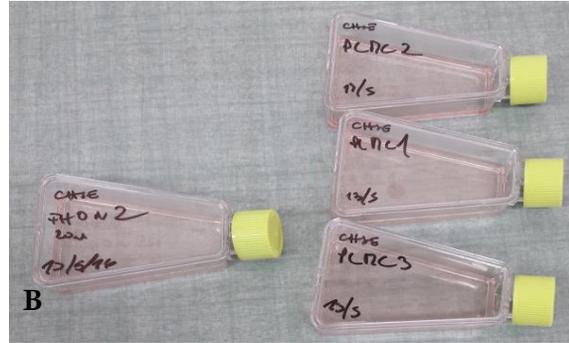


Envío de las muestras en condiciones de baja temperatura (A y B). Tubos con órganos de peces (Bazo, Riñón), mantenidos en medio de cultivo L-15, o alevines completos (C y D). Las muestras de órganos son pesadas y posteriormente homogenizadas, en condiciones estériles (E y F).





A



B



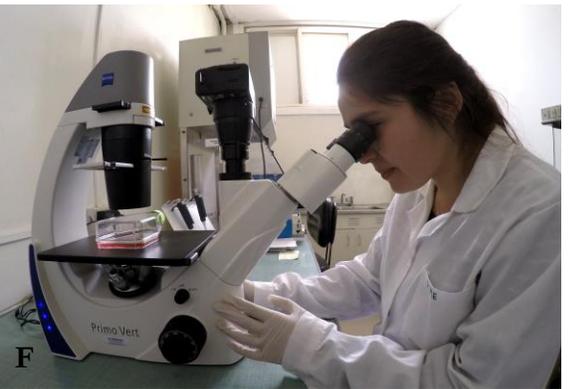
C



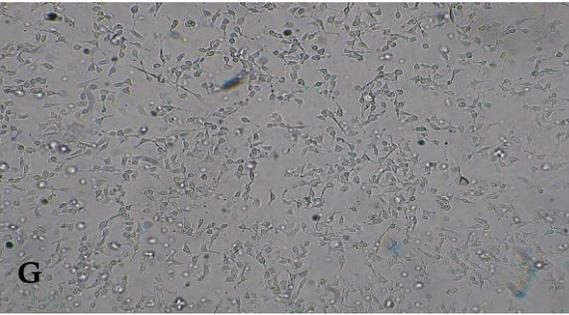
D



E

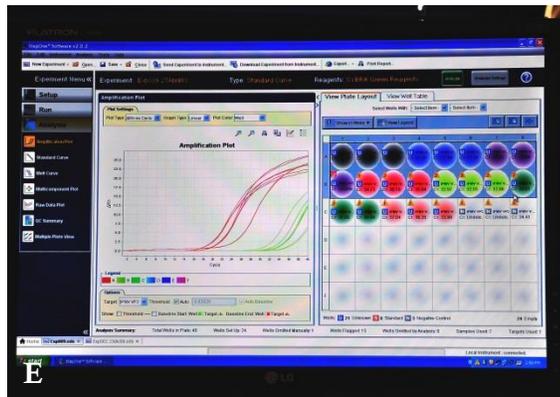
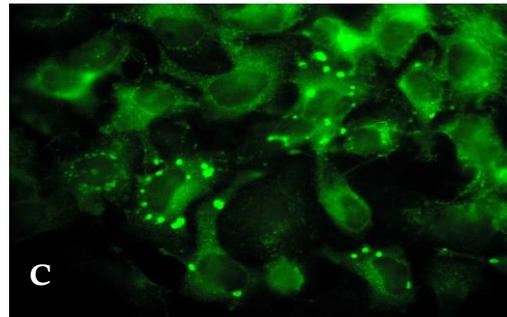
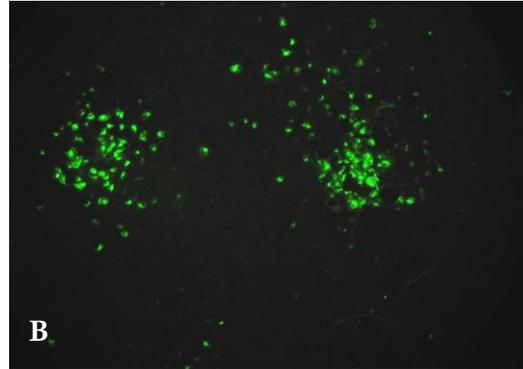


F



G

Infección de células para el aislamiento viral y estimación del título viral mediante inmunofluorescencia (A y B). Mantenimiento de los aislados virales a -80°C (C). Estimación de cantidad de material genético de los extractos (D). Mantenimiento de las líneas celulares y visualización de los cultivos y del efecto citopático producido por la infección viral. (E, F y G)



Microscopio de Fluorescencia (A) y visualización de células infectadas con el virus IPN, mediante inmunofluorescencia (B y C). Ensayo de PCR en Tiempo Real (D y E)

## Anexo 6: Manuscrito publicado y manuscrito enviado

### Manuscrito publicado

Lat. Am. J. Aquat. Res., 44(4): 860-868, 2016  
DOI: 10.3856/vol44-issue4-fulltext-23

860

#### Short Communication

### Genotipificación y relación hospedador-específica del virus de la necrosis pancreática infecciosa en Chile

Pamela Torres<sup>1</sup>, Yoanna Eissler<sup>1</sup>, David Tapia<sup>2</sup>, Juan Carlos Espinoza<sup>1</sup> & Juan Kuznar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales  
Instituto de Química y Bioquímica Facultad de Ciencias  
Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

<sup>2</sup>Doctorado en Acuicultura, Programa Cooperativo Universidad de Chile  
Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile  
Corresponding author: Yoanna Eissler (yoanna.eissler@uv.cl)

**RESUMEN.** Se analizaron muestras de órganos (riñón y bazo) de las principales especies de salmónidos cultivados en Chile a través de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidado) para detectar la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). La técnica resultó ser eficiente y sensible, permitiendo amplificar material genético del virus para su secuenciación directamente desde los tejidos, incluso desde muestras que no pudieron ser aisladas en cultivo celular. A través del análisis filogenético se detectaron los dos genogrupos descritos previamente en el país, *i.e.*, europeo (Genogrupo 5) y americano (Genogrupo 1), siendo cuantitativa-mente predominantes los IPNV del Genogrupo 5 (78,8%). Dentro del Genogrupo 1, se observó claramente la formación de un sub-grupo de virus chilenos separados de las cepas de referencia (*e.g.*, WB, VR-299), por lo que se propone su denominación como genotipo chileno. Adicionalmente, se observó una relación estadística-mente significativa hospedador-específica entre los genogrupos identificados: los virus del Genogrupo 5 provienen de *Salmo salar* mientras que los del Genogrupo 1 provienen de *Oncorhynchus mykiss* u *O. kisutch* ( $P < 0,001$ ). La asociación de esta relación hospedador-específica con la virulencia puede proveer información importante para el manejo y control de IPNV en Chile.

**Palabras clave:** virus, IPNV, PCR anidado, genotipificación, filogenia, relación hospedador-específica, gen VP2.

### Genotyping and host-specific relationship of infectious pancreatic necrosis virus in Chile

**ABSTRACT.** Samples of fish organs (kidney and spleen) from the main salmonid species farmed in Chile were analyzed through the nested polymerase chain reaction (nested PCR) to detect the presence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). The technique proved to be efficient and sensitive, allowing amplification of viral genetic material for sequencing directly from tissue, even from samples that could not be isolated in cell culture. The phylogenetic analysis showed the two genogroups previously described in the country, *i.e.*, European (Genogroup 5) and American (Genogroup 1), being the IPNV that belong to Genogroup 5 the dominant one (78.8%). It is clear that the Chilean IPN viruses are clustered within the Genogroup 1 forming a sub-group that is separated from the reference strains (*e.g.*, WB, VR-299), hence we propose its denomination as a Chilean genotype. Additionally, a statistically significant host-specific relationship was observed between the genogroups identified: viruses from Genogroup 5 were detected in *Salmo salar*, while the ones from Genogroup 1 were detected in *Oncorhynchus mykiss* or *O. kisutch* ( $P < 0.001$ ). The association of this host-specific relationship with the virulence can provide important information for the management and control of IPNV in Chile.

**Keywords:** virus, IPNV, nested PCR, genotyping, phylogeny, host-specific relation, VP2 gene.

Corresponding editor: Sandra Bravo

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es el agente causante de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), enfermedad que afecta principalmente a salmónidos cultivados en condiciones de producción intensiva. Se le atribuyen mortalidades en la fase de alevín de hasta el 100% y de 10 a 20% en *post-smolts* luego de su traspaso a jaulas en el mar (Evensen & Santi, 2008).

La enfermedad presenta alta prevalencia y se encuentra diseminada en la mayoría de los países donde se cultivan salmones (Munro & Midtlyng, 2011). En Chile, el primer reporte y caracterización del virus se realizó en 1984 (McAllister & Reyes, 1984; Espinoza *et al.*, 1985); sin embargo, pasaron varios años hasta que se constató la presencia de la enfermedad en 1998 (Taud & Palacios, 2003). Desde entonces, la enfermedad se extendió rápidamente por las diferentes áreas de cultivo del país, afectando principalmente a alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), aunque también ha sido reportada en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (SERNAPESCA, 2015). Actualmente, IPN es considerada endémica y prevalente en Chile, y según los últimos informes sanitarios publicados por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA), el virus IPN es uno de los patógenos detectado con mayor frecuencia por laboratorios de diagnóstico y una de las principales causas de mortalidad por enfermedades prevalentes que afectan a salmones (SERNAPESCA, 2013, 2014b, 2015).

El IPNV pertenece al género *Aquabirnavirus*, cuyos integrantes se caracterizan por tener un genoma ARN de doble cadena, que consta de dos segmentos, A (3.097 pb) y B (2.787 pb) (Dobos, 1995). El segmento A posee dos marcos de lectura abierta (ORF) superpuestos: el más grande codifica para una poliproteína de 106 kDa en el orden NH<sub>2</sub>-pVP2-NS-VP3-COOH y el más pequeño codifica para un polipéptido rico en arginina, conocido como VP5 (Duncan *et al.*, 1987; Dobos, 1995). Por otro lado, el segmento B codifica para el polipéptido VP1 de 94 kDa que corresponde a la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Esta proteína se encuentra presente en dos formas: como un polipéptido libre o unido covalentemente al extremo 5' de los dos segmentos del ARN genómico (VPg) (Dobos, 1995).

Actualmente los *Aquabirnavirus* se clasifican en base a la secuencia de la región codificante de la proteína VP2 en 8 genogrupos. La primera clasificación filogenética fue propuesta por Blake *et al.* (2001), donde se describió la presencia de 6 genogrupos, compuestos por diferentes cepas de origen europeo, americano y asiático. Posteriormente, Nishizawa *et al.* (2005) revelaron la existencia de un séptimo genogrupo

integrado únicamente por cepas japonesas, y recientemente en Australia se aisló un nuevo *Aquabirnavirus* desde trucha arcoiris, que fue clasificado en un octavo genogrupo (McCowan *et al.*, 2015; Mohr *et al.*, 2015). En Chile, los virus IPN que han sido caracterizados genéticamente pertenecen a los Genogrupos 1 y 5, *i.e.*, norteamericanos y europeos, respectivamente (Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016), dentro de los cuales forman sus propios subtipos o subgrupos (Tapia *et al.*, 2015). Sin embargo, existe muy poca información acerca de la predominancia de cada uno de estos genogrupos y su interacción con las distintas especies hospedadoras de salmónidos cultivadas en el país.

La reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidado) ha probado ser una técnica de detección rápida y sensible para el IPNV (Rimstad *et al.*, 1990; López-Lastra *et al.*, 1994; Barlić-Majanga *et al.*, 2002; Cutrín *et al.*, 2005), ya que permite amplificar y concentrar el material genético del virus y detectarlo aun en casos en que los títulos virales son muy bajos (Alonso *et al.*, 1999). Debido a esto, la técnica puede ser utilizada para la amplificación y posterior secuenciación de un segmento del genoma del IPNV directamente desde muestras de tejidos de peces, sin la necesidad de realizar el aislamiento en cultivo celular de los virus, acortando considerablemente el tiempo para su genotipificación.

El objetivo de este trabajo es realizar la genotipificación de virus IPN, directamente a partir de muestras de órganos de salmónidos, para determinar la predominancia de cada uno de los genogrupos identificados y establecer si existe una relación hospedador-específica entre estos genogrupos y las especies de salmónidos cultivados en Chile.

Para esto, se tomaron muestras de órganos (riñón y bazo) de peces salmónidos de las tres especies cultivadas en el país y se fijaron en etanol al 95%. Las muestras fueron colectadas entre noviembre 2009 y agosto 2015, en 19 localidades diferentes, tanto de centros de agua dulce como de mar, y corresponden a mortalidad fresca (código CUP) o de centros en los cuales previamente se registró mortalidad por IPN. Muestras con el mismo código fueron colectadas en el mismo centro o piscicultura (Tabla 1).

En el laboratorio, los órganos fijados fueron homogeneizados con un mortero en PBS tampón 1X, pH 7,2 y centrifugados a 2.000 g por 15 min a 4°C en una centrífuga MIKRO 22R (Hettich zentrifugen). Posteriormente, se extrajo el sobrenadante para luego ser almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis.

**Tabla 1.** Información de las muestras de virus IPNV utilizadas en este estudio. \*Virus reportados en el trabajo de Tapia *et al.* (2015).

Código muestra	Fecha muestreo	Especie infectada	Estado de desarrollo	Origen ambiental	Origen geográfico	Número de acceso
P1-P10	nov-09	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Cochamó	JN163859 JN163860 JN163861 JN163862 JN163863 JN163864 JN163865 JN163866 JN163867 JN163868
CUP44	ago-10	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Fiordo Cupquelán	JN180649
CUP24	ago-10					JN180651
CUP60	oct-10					JN180653
CUP58	oct-10					JN180650
CUP68	oct-10					JN180654
CUP52	oct-10					JN180652
IHJS1	may-12	<i>O. mykiss</i>	Alevín	Agua dulce	Cochamó, Río Patas	KF735904*
IHJS3	may-12					KF735905*
RV02	nov-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Pta. Arenas/km1 7,5 Norte	KF735914*
RV06	nov-12					KF735916*
MADA1	nov-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Chayahué-Pargua	KF735912*
CNJJ1	nov-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Chayahué-Pargua	KF735897*
CNJJ2	nov-12					KF735898*
CNJJ3	nov-12					KF735899*
ATS3	dic-12	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Estero de Reloncaví, Punta Chaparano	KU605637
DANN3	dic-12	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Isla Tranqui-Pta. Pompon	KF735900*
KOMA4	dic-12	<i>S. salar</i>	Alevín	Agua dulce	Río Pescado, Puerto Varas	KF735909*
KOMA5	dic-12					KF735910*
KOMA6	dic-12					KF735911*
ADMV1	mar-13	<i>O. mykiss</i>	Smolt	Río	Río Maullin, Chuyaquén	KF735886*
ADMV2	mar-13					KF735887*
EBPS1	ago-13	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Hualaihué	KU605647
EBPS2	ago-13					KU605648
EBPS3	ago-13					KU605649
MPMA1	ago-13	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Conta o, Hualaihué, Seno de Reloncaví	KU605641
MPMA2	ago-13					KU605642
CGCP1	nov-13	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Canal Aysén	KU605643
CGCP3	nov-13					KU605644
CGCP4	nov-13					KU605645
CGCP5	nov-13					KU605646
IPNV01.3	ene-14	<i>S. salar</i>	Smolt	Lago	Lago Puyehue	KU605656
IPNV03.8	feb-14	<i>O. mykiss</i>	Alevín	Río	Sector Vivanco, Río Bueno	KU605657
IPNV03.9	feb-14					KU605658
ABCD1	feb-14	<i>O. kisutch</i>	Juvenil	Lago	Lago Rupanco	KU605638
ABCD3	feb-14					KU605639
LKJH4	feb-14	<i>O. kisutch</i>	Juvenil	Lago	Lago Rupanco	KU605654
LKJH6	feb-14					KU605655
PITR2	mar-14	<i>O. mykiss</i>	Alevín	Río	Río Pilmaiquén, Sector La Poza	KU605640

## Continuación

Código muestra	Fecha muestreo	Especie infectada	Estado de desarrollo	Origen ambiental	Origen geográfico	Número de acceso
AYCH1	abr-14	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Isla Luz	KU605650
AYCH3	abr-14					KU605651
AYCH4	abr-14					KU605652
AYCHV1	abr-14					KU605653
CHMD1	ago-15	<i>S. salar</i>	Engorda	Mar	Isla Traiguén	KU605661
CHMD2	ago-15					KU605662
SFAA1	ago-15	<i>S. salar</i>	Smolt	Mar	Rada Potrerros de Cholgo	KU605659
SFAA2	ago-15					KU605660

La extracción del ARN viral se realizó directamente desde el homogeneizado de tejido. Se tomó un total de 720  $\mu\text{L}$  del homogeneizado de cada muestra y se extrajo el material genético utilizando el kit E.Z.N.A.™ Total RNA Kit I (OMEGA bio-tek) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN total extraído fue determinada mediante la medición de absorbancia a 260 y 280 nm usando el espectrofotómetro MaestroNano® (Maestrogen). Las muestras cuya concentración fue  $>10$  ng ARN total  $\mu\text{L}^{-1}$  fueron diluidas en proporción de 1:10, mientras que las que presentaron una concentración  $>100$  ng de ARN total  $\mu\text{L}^{-1}$  fueron diluidas a razón de 1:100.

Una vez obtenido el material genético se amplificó una región de 1.180 pb del gen de la proteína VP2 mediante la técnica de RT-PCR utilizando el equipo PCR Multigene (Labnet). Para esto, se mezclaron 3  $\mu\text{L}$  de ARN viral con los partidores A1F (5'-TGAGA TCCATTATGCTTCCAGA-3') y A2R (5'-GACAG GATCATCTTGGCATAGT-3') (Blake *et al.*, 1995) a una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$  con 10  $\mu\text{L}$  del 2X Master Mix Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qRT-PCR (Stratagene), 0,8  $\mu\text{L}$  de RT/RNase block y 4,2  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas en un volumen total de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . La reacción se desarrolló en base al siguiente perfil de temperaturas: 42°C por 30 min para la retrotranscripción, 95°C por 3 min para la inactivación de la retrotranscriptasa y activación de la polimerasa, 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturalización, 58°C por 30 s para hibridación y 72°C por 100 s para la elongación, y la extensión final a 72°C por 10 min.

El producto amplificado fue utilizado como templado para realizar una segunda amplificación y así completar el proceso de PCR anidado. Este segundo PCR consistió en amplificar un fragmento de una longitud esperada de 523 pb. Para esto, se mezclaron 1,5  $\mu\text{L}$  del templado con los partidores WB1 (5'-CCGC AACTTACTTGAGATCCATTATGC-3') (Williams *et al.*, 1999) y AIR (5'-GTCTCGTCTCWAGBCG GACGTATG-3') (Tapia *et al.*, 2015) a una concen-

tración final de 0,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{L}$  de 2X DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) y 10,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas en un volumen total de reacción de 30  $\mu\text{L}$ . La reacción se desarrolló en base al siguiente perfil de temperaturas: 95°C por 5 min para la activación de la ADN polimerasa Taq, 35 ciclos de 95°C por 30 s para desnaturalización, 60°C por 30 s para hibridación y 72°C por 45 s para la elongación, y la extensión final a 72°C por 10 min.

El fragmento amplificado resultante del PCR anidado se separó mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1,2%. Una vez diferenciadas las bandas, éstas se cortaron y se transfirieron a tubos de microcentrífuga, para luego ser purificadas usando el kit E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit (OMEGA bio-tek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido de cada muestra fue eluido con 55  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular. Los productos purificados se secuenciaron por duplicado en Macrogen Inc., Corea, usando un analizador de ADN modelo ABI3730XL (Applied Biosystems).

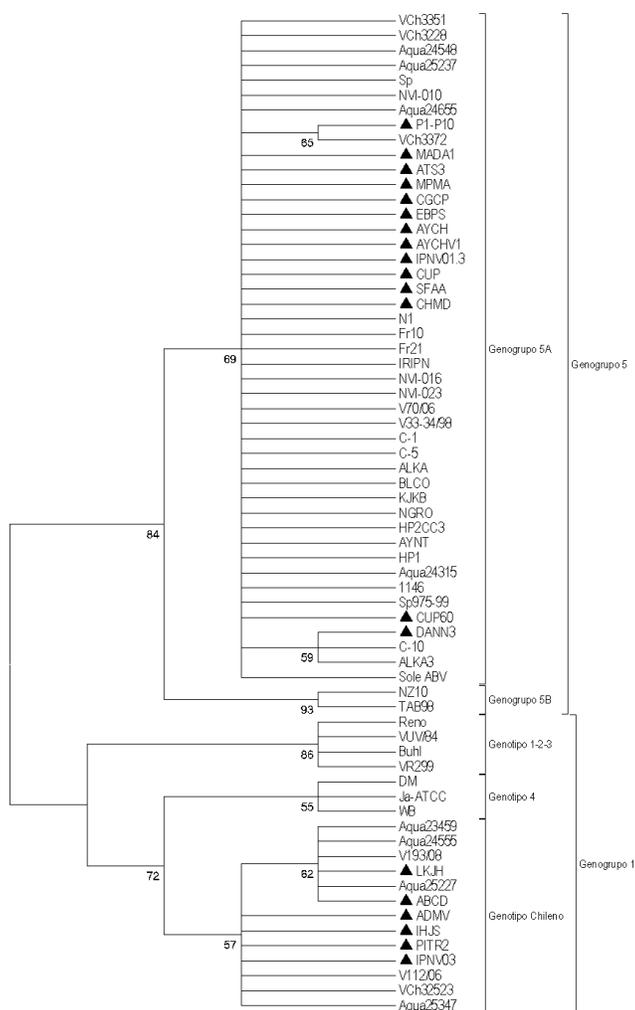
Las secuencias obtenidas se compararon y clasificaron en base a cepas de referencia de birnavirus acuáticos chilenos y extranjeros disponibles en Genbank y reportadas en publicaciones científicas (*i.e.*, Blake *et al.*, 2001; Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Ruane *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016). Además se incluyen algunas muestras utilizadas también en el trabajo realizado por Tapia *et al.* (2015) (ver Tabla 1). El análisis y edición de las secuencias se realizó con el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013), por medio de un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el algoritmo *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente, se construyó un árbol en base a la composición de los aminoácidos derivados de las secuencias con el método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) usando el modelo de sustitución distancia p. La validez estadística de los resultados obtenidos con el árbol, se evaluó mediante el método estadístico *Bootstrap* con 1.000 ciclos de iteraciones.

La técnica de PCR anidado utilizada permitió confirmar de manera rápida y eficiente la presencia de IPNV en las muestras analizadas, tomando el proceso completo no más de un día. Adicionalmente, con el producto obtenido de la segunda ronda de PCR se secuenció un fragmento de la proteína VP2 de 523 pb aproximadamente. Con este fragmento se construyó un árbol filogenético condensado (Fig. 1), donde se muestran solo los Genogrupos 1 y 5. Es importante recalcar que en este estudio, se trabajó directamente a partir de muestras de tejido infectado de peces y no con aislados virales; por lo que la técnica permite obtener material genético para realizar la secuenciación y posterior genotipificación de los virus sin tener que realizar el laborioso proceso de cultivo celular e infección, que puede tardar más de dos semanas. Esto fue confirmado en el trabajo de Tapia *et al.* (2015) donde algunas de las muestras analizadas aquí, fueron también aisladas en células CHSE-214 y posteriormente amplificadas de forma convencional para su secuenciación, obteniendo secuencias casi idénticas a las obtenidas mediante el PCR anidado. De esta forma, la técnica del PCR anidado permitió incluso amplificar muestras con material genético de virus que no pudieron ser aislados en cultivo celular (*i.e.*, CUP, P1-10, ATS3, PITR2, IPNV03, AYCH, AYCHV, IHJS, MADA, DANN y ADMV). Otros autores han logrado resultados similares a los descritos en este trabajo, Cutrín *et al.* (2005) por ejemplo, comparó los métodos de aislamiento en cultivo celular, RT-PCR y PCR anidado, para la detección de IPNV en muestras de sangre de turbot (*Scophthalmus maximus*) asintomáticos. Los resultados mostraron, que ambas técnicas basadas en PCR fueron más sensibles que el aislamiento en cultivo celular; y además la técnica de PCR anidado logró detectar IPNV en un mayor número de peces muestreados en comparación con el RT-PCR.

El análisis filogenético a nivel de aminoácidos (Fig. 1) muestra que los virus de este estudio se clasifican dentro de los dos genogrupos previamente reportados en el país, el Genogrupo 1 y 5 (Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016). En la Figura 1 se observan dos subgrupos dentro del Genogrupo 5, el 5A que incluyó los virus reportados para Chile, en este y otros trabajos anteriores y el 5B que agrupó cepas de origen australiano. En el Genogrupo 1 se distinguen a su vez tres subgrupos, uno correspondiente a los genotipos 1-3 del análisis filogenético mostrado por Blake *et al.* (2001), otro solamente compuesto por el genotipo 4 y un último compuesto únicamente por los virus chilenos de este estudio y los reportados en trabajos previos. Este subgrupo también fue reportado por Tapia *et al.* (2015), por lo que sugerimos que este

clúster sea considerado como un genotipo chileno dentro del Genogrupo 1. La única excepción a este subgrupo es la cepa VUV/84, que corresponde a la cepa original aislada en 1984 en Chile y mantenida en cultivo celular desde esa fecha. Esto podría estar asociado a que dentro de una población viral se espera que se genere un sinnúmero de variantes genéticas en su continua búsqueda de eficacia biológica, por lo que la población viral resultante se origina en respuesta adaptativa a esta dinámica (Domingo *et al.*, 2000). Sin embargo, el genoma de la cepa VUV/84, no ha sido sometido a la misma presión selectiva ni ha competido con la actual población de virus chilenos en los procesos de mutación, por lo que no formaría parte de este clúster. Al analizar en conjunto los datos publicados de todos los virus IPNV secuenciados en Chile durante los últimos años (Eissler *et al.*, 2011; Mutoloki & Evensen, 2011; Calleja *et al.*, 2012; Tapia *et al.*, 2015; Jorquera *et al.*, 2016), se observa que están distribuidos en todas las regiones del país donde hay producción masiva de salmónidos (*i.e.*, Los Ríos, Los Lagos, Aysén y Magallanes), y que existe una predominancia de las cepas clasificadas en el Genogrupo 5 (78,8%) sobre el Genogrupo 1 (21,2%) (Tabla 2). Además, el virus infecta a todas las especies de salmónidos cultivadas en el país, con una mayor incidencia en *S. salar*, como también lo demuestran los informes sanitarios de SERNAPESCA, donde esta especie es la que muestra mayor porcentaje de mortalidad causada por IPNV y el mayor número de diagnósticos de la enfermedad (SERNAPESCA, 2014a).

En la Tabla 2 se observa que, para este trabajo, todos los IPNV chilenos del Genogrupo 1, fueron detectados en trucha arcoíris (*O. mykiss*) o salmón coho (*O. kisutch*), mientras que los virus del Genogrupo 5 se encontraron en salmón del Atlántico (*S. salar*), indicando una posible relación hospedador-específica de los genogrupos identificados. Esta relación, también se observó al realizar el análisis de todos los virus secuenciados y reportados en el país, donde el 100% de los virus clasificados dentro del Genogrupo 1 resultó ser del género *Onchorhynchus* y el 97,6% del Genogrupo 5 fue detectado en *S. salar* (Tabla 2). Sin embargo, esta asociación no es exclusiva, como se reporta en el trabajo realizado por Callejas *et al.* (2012), donde virus clasificados como Sp (Genogrupo 5) por la técnica de RT-PCR en tiempo real fueron detectados en muestras de truchas arcoíris. Asimismo, se han secuenciado aislados provenientes de alevín de trucha arcoíris (Tapia *et al.*, 2015) y salmón coho (Jorquera *et al.*, 2016), que resultaron clasificados dentro del Genogrupo 5. Para probar estadísticamente la asociación entre los genogrupos, a nivel de género y es-



**Figura 1.** Árbol filogenético condensado construido en base a las secuencias de aminoácidos deducidas de VP2 mediante el método de *Neighbor-Joining* con un *bootstrap* de 1000 iteraciones. El grado de cercanía entre las secuencias se calculó mediante el método de distancia p. Los triángulos negros representan a los virus secuenciados en este trabajo.

pecie, se realizó el test de exactitud de Fisher utilizando el sitio web GraphPad QuickCalcs (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>), resultando la relación en ambos casos como altamente significativa entre las variables ( $P < 0,001$ ). Este tipo de relación hospedador-específica también ha sido reportada para otros virus de salmónidos, como el virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV) en Norteamérica, donde la mayoría de los aislados de los genogrupos

denominados U y M, provienen predominantemente de salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) y trucha arcoíris, respectivamente (Garver *et al.*, 2003). Estudios basados en desafíos experimentales con ambas especies y genogrupos han mostrado que esta relación está asociada a una virulencia específica para cada hospedador (*i.e.*, mortalidad causada por la infección), la cual depende principalmente de la capacidad del virus de entrar en el pez hospedador y de replicarse rá-

**Tabla 2.** Información IPNV chilenos secuenciados. ( ) Número de IPNV secuenciados, NR no reportado. \*Sin considerar virus incluidos en Tapia *et al.* (2015). \*\*Sin considerar virus incluidos en Tapia *et al.* (2015) y Jorquera *et al.* (2016).

Referencia	Región	Origen	IPNV Genogrupo 5		IPNV Genogrupo 1		Número de acceso
			Nº	Especies hospederas	Nº	Especies hospederas	
Mutoloki & Evensen (2011)	Los Lagos	Agua dulce	10	<i>S. salar</i>	-	-	HQ457169-HQ457178
Eissler <i>et al.</i> (2011)	Araucanía, Los Ríos, Los Lagos	Agua dulce	2	<i>S. salar</i>	3	<i>O. mykiss</i> (2) <i>O. kisutch</i> (1)	HQ738515- HQ738519
Calleja <i>et al.</i> (2012)	NR	Agua dulce	6	<i>S. salar</i>	1	<i>O. kisutch</i>	JN642215-JN642221
Tapia <i>et al.</i> (2015)	Araucanía, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	24	<i>S. salar</i> (23) <i>O. mykiss</i> (1)	5	<i>O. mykiss</i>	KF954910-KF954930/ KF735886-KF735900/ KF735903-KF735916
Jorquera <i>et al.</i> (2016)*	Los Ríos, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	11	<i>S. salar</i> (10) <i>O. kisutch</i> (1)	8	<i>O. mykiss</i> (1) <i>O. kisutch</i> (7)	KU609568-KU609576/ KU609580-KU609581/ KU609583-KU609587/ KU609589-KU609591/ KU609594-KU609602/ KU609606-KU609607/ KU609609-KU609613/ KU609615-KU609617
Este estudio**	Los Ríos, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	29	<i>S. salar</i>	5	<i>O. mykiss</i> (3) <i>O. kisutch</i> (2)	JN163859-JN163868/ JN180649-JN180654/ KU605637/ KU60563- KU605640/KU605642/ KU605644-KU605645/ KU605649-KU605654/ KU605657-KU605662
Total	Coquimbo, Araucanía, Los Lagos, Aysén, Magallanes	Agua dulce y mar	82	<i>S. salar</i> (80) <i>O. mykiss</i> (1) <i>O. kisutch</i> (1)	2	<i>O. mykiss</i> (11) <i>O. kisutch</i> (11)	

pidamente (Peñaranda *et al.*, 2009, 2011; Purcell *et al.*, 2009). De igual forma, la relación hospedador-específica encontrada en muestras de campo en este estudio podría ser confirmada mediante el desarrollo de un estudio de infección *in vivo* de ambos genogrupos del virus IPN en salmón del Atlántico y especies del género *Oncorhynchus*, para determinar si también está asociada al nivel de virulencia que estos genogrupos puedan presentar en cada especie. La confirmación de esta relación hospedador-específica mediante desafíos experimentales puede proveer información importante para el manejo y control del IPNV en Chile.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente a los inspectores de SERNAPESCA por su ayuda en la realización de los muestreos. Este estudio fue financiado por los siguientes proyectos: Proyecto SERNAPESCA R.E.Nº 1090 "Estudio de evaluación y estandarización de métodos de diagnósticos para la determinación del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa IPNV";

Proyecto DIUV-CID N°01/03; Proyecto SUBPESCA R.EX N°1548, código 2013-32-17 "Identificación de cepas y nuevas variantes del Virus IPN y evaluación del impacto de éstas en atención a su distribución geográfica y características de cuadros clínicos", Proyecto "Evaluación hidrográfica y epidemiológica del Fiordo Cupquelán, Región Aysén (Primera Etapa)", Salmones Cupquelán S.A. y Proyecto FIP N° 2014-60: "Determinación de factores epidemiológicos de riesgo en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa".

#### REFERENCIAS

- Alonso, M., S. Rodríguez & S.I. Pérez-Prieto. 1999. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol. Meth.*, 81(1-2): 1-9.
- Barlič-Maganja, D., M. Štrancar, P. Hostnik, V. Jenčič & J. Grom. 2002. Comparison of the efficiency and sensitivity of virus isolation and molecular methods

- for routine diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, 25(2): 73-80.
- Blake, S., J.Y. Ma, D.A. Caporale, S. Jairath & B.L. Nicholson. 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment a cDNA. *Dis. Aquat. Org.*, 45(2): 89-102.
- Blake, S.L., W.B. Schill, P.E. McAllister, M.K. Lee, J.T. Singer & B.L. Nicholson. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 33(4): 835-839.
- Calleja, F., M.G. Godoy, J.G. Cárcamo, I. Bandín, A.J. Yáñez, C.P. Dopazo, F.S. Kibenge & R. Avendaño-Herrera. 2012. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with universal probe library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. *J. Virol. Meth.*, 183(1): 80-85.
- Cutrín, J.M., C. López-Vázquez, J.G. Oliveira, S. Castro, C.P. Dopazo & I. Bandín. 2005. Isolation in cell culture and detection by PCR-based technology of IPNV-like virus from leucocytes of carrier turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, 28(12): 713-722.
- Dobos, P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annu. Rev. Fish Dis.*, 5: 25-54.
- Domingo, E., E. Baranowski, J.I. Núñez, C.M. Ruiz-Jarabo, S. Sierra, N. Molina & F. Sobrino. 2000. Cuasiespecies y evolución molecular de virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19(1): 55-63.
- Duncan, R., E. Nagy, P.J. Krell & P. Dobos. 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein, detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment a coding regions. *J. Virol.*, 61(12): 3655-3664.
- Eissler, Y., M.S. Pavlov, P. Conejeros, J.C. Espinoza & J. Kuznar. 2011. Detection and quantification of Chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time RT-PCR assays using segment b as a target. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(3): 544-552.
- Espinoza, E., G. Fariás, M. Soler & J. Kuznar. 1985. Identity between Infectious Pancreatic Necrosis Virus VR-299 and a Chilean isolate. *Intervirology*, 24(1): 58-60.
- Evensen, Ø. & N. Santi. 2008. Infectious Pancreatic Necrosis Virus. In: B.W.J. Mahy & M.V.H. Van Regenmortel (eds.). *Encyclopedia of virology*. Elsevier, Oxford, pp. 83-89.
- Garver, K.A., R.M. Troyer & G. Kurath. 2003. Two distinct phylogenetic clades of infectious hematopoietic necrosis virus overlap within the Columbia River basin. *Dis. Aquat. Org.*, 55(3): 187-203.
- Jorquera, E., P. Morales, D. Tapia, P. Torres, Y. Eissler, J.C. Espinoza, P. Conejeros & J. Kuznar. 2016. Chilean IPNV isolates: robustness analysis of PCR detection. *Electron. J. Biotechnol.*, 20: 28-32.
- López-Lastra, M., M. Gonzalez, M. Jashes & A.M. Sandino. 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.*, 17(3): 269-282.
- McAllister, P.E. & X. Reyes. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.*, 7(4): 319-322.
- McCowan, C., J. Motha, M.S. Crane, N.J. Moody, S. Cramer, A.D. Hyatt & T. Bradley. 2015. Isolation of a novel aquatic birnavirus from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 114(2): 117-125.
- Mohr, P.G., N.J. Moody, L.M. Williams, J. Hoard & M.S. Crane. 2015. Molecular characterization of Tasmanian aquabirnaviruses from 1998 to 2013. *Dis. Aquat. Organ.*, 116(1): 1-9.
- Munro, E.S. & P.J. Midtlyng. 2011. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In: P.T.K. Woo & D.W. Bruno (eds.). *Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections*. CAB International, Oxfordshire, pp. 1-65.
- Mutoloki, S. & O. Evensen. 2011. Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of infectious pancreatic necrosis virus point towards a common origin. *J. Gen. Virol.*, 92: 1721-1726.
- Nishizawa, T., S. Kinoshita & M. Yoshimizu. 2005. An approach for genogrouping of Japanese isolates of aquabirnaviruses in a new genogroup, VII, based on the VP2/NS junction region. *J. Gen. Virol.*, 86: 1973-1978.
- Peñaranda, M.M.D., M.K. Purcell & G. Kurath. 2009. Differential virulence mechanisms of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) include host entry and virus replication kinetics. *J. Gen. Virol.*, 90: 2172-2182.
- Peñaranda, M.M.D., A.R. Wargo & G. Kurath. 2011. *In vivo* fitness correlates with host-specific virulence of Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in sockeye salmon and rainbow trout. *Virology*, 417(2): 312-319.
- Purcell, M.K., K.A. Garver, C. Conway, D.G. Elliott & G. Kurath. 2009. Infectious hematopoietic necrosis virus genogroup-specific virulence mechanisms in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) from Redfish Lake Idaho. *J. Fish. Dis.*, 32(7): 619-631.

- Rimstad, E., E. Hornes, O. Olsvik & B. Hyllseth. 1990. Identification of a double-stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. *J. Clin. Microbiol.*, 28(10): 2275-2278.
- Ruane, N.M., S.J. McCleary, L.J. McCarthy & K. Henshilwood. 2015. Phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Ireland reveals the spread of a virulent genogroup 5 subtype previously associated with imports. *Arch. Virol.*, 160(3): 817-824.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406-425.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2013. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2012. [[https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=startdown&id=6820](https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=6820)]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2014a. Informe sanitario salmonicultura en centros marinos primer semestre año 2014. [[https://www.sernapesca.cl/presentaciones/PPT\\_Informe%20Sanitario\\_1er\\_Semestre\\_2014.pdf](https://www.sernapesca.cl/presentaciones/PPT_Informe%20Sanitario_1er_Semestre_2014.pdf)]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2014b. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2013. [[https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8014](https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8014)]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2015. Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos 1° semestre 2015. [[https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=14754](https://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=14754)]. Revisado: 12 Enero 2016.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725-2729.
- Tapia, D., Y. Eissler, P. Torres, E. Jorquera, J.C. Espinoza & J. Kuznar. 2015. Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Dis. Aquat. Org.*, 117(3): 173-184.
- Taud, S. & S. Palacios. 2003. La acuicultura en Chile. TechnoPress y Salmon Chile, Santiago, 335 pp.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22(22): 4673-4680.
- Williams, K., S. Blake, A. Sweeney, J.T. Singer & B.L. Nicholson. 1999. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 37(12): 4139-4141.

*Received: 29 February 2016; Accepted: 8 July 2016*



yoanna eissler <yoanna.eissler@uv.cl>

---

## Your Submission

---

Editor EJBT <eesserver@eesmail.elsevier.com>

20 de marzo de 2017, 10:22

Responder a: Editor EJBT <biotec@pucv.cl>

Para: yoanna.eissler@uv.cl, yeissler@gmail.com

Cc: biotec@pucv.cl

Ms. Ref. No.: EJBT-D-16-00199

Title: Inter laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile  
Electronic Journal of Biotechnology

Dear Professor Yoanna Eissler,

The reviewers have commented on your above paper. They indicated that you must revise the article addressing carefully all the issues raised in the comments.

The revised manuscript must be resubmitted, no later than Apr 04, 2017. Let us know if you need more time.

When you submit the revised manuscript:

a) outline each change made (point by point) as raised in the reviewer comments, highlighting all modifications in the text.

AND

b) provide a suitable rebuttal to each reviewer comment not addressed

To submit your revision, please do the following:

1. Go to: <https://ees.elsevier.com/ejbt/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Needing Revision]

We look forward to receiving your revised manuscript.

Kind regards,

Andres Illanes and Graciela Munoz  
Editors

Reviewers' comments:

Reviewer #2: The article by Tapia et al. describes the development and outcomes of an inter laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile.

The authors have successfully described the need to conduct their ring trial and the outcomes emanating from it. Standardisation and harmonisation of molecular tools for this economically-significant virus in Chile (IPNV) is clearly

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=2b4e1e3f15&view=pt&m sg=15aebe24c873cdf4&q=EJBT&q s=true&search=query&siml=15aebe24c873cdf4>

1/3

# Inter laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile

David Tapia<sup>a</sup>, Yoanna Eissler<sup>b\*</sup>, Juan Carlos Espinoza<sup>b</sup>, Juan Kuznar<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Doctorado en Acuicultura, Programa Cooperativo Universidad de Chile, Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

<sup>b</sup>Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales, Instituto de Química y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Gran Bretaña 1111, Valparaíso, Chile, postal code: 2360102.

\*Corresponding author: [yoanna.eissler@uv.cl](mailto:yoanna.eissler@uv.cl)

The authors David Tapia and Yoanna Eissler contributed equally to this work.

Short title: Inter-laboratory ring trial for IPNV detection

## Abstract

*Background:* Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) it is the etiological agent of a highly contagious disease that affects salmonids. In Chile, which is the second worldwide salmon producer and exporter, causes great economic losses and is one of the most frequent detected pathogens. Due to its high level of persistence and the lack of information about the efficiency of the methods to diagnose the presence of the virus, the first inter laboratory ring trial was performed in order to evaluate the sensitivity, specificity and repeatability of the techniques used to detect IPNV.

*Results:* Results showed a high sensitivity and specificity for qRT-PCR for most of the laboratories. Three of the 12 laboratories presented values lower than 100% in sensitivity and one in specificity. Problems in specificity corresponding to false positive, were most likely caused by cross contamination of the samples, while errors in sensitivity were due to detection problems of the least concentrated viral sample. Regarding repeatability, large differences for the Ct values were detected among the laboratories.

*Conclusions:* The inter laboratory comparison results confirm that sensitivity and specificity were achieved where repeatability failed, this last issue needs to be addressed in order to allow harmonized diagnostic of IPNV within the country.

**Key words:** IPNV, qRT-PCR, diagnosis, validation, ring test

## 1. Introduction

Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) is a highly contagious disease caused by a non-enveloped, bi-segmented, double-stranded RNA virus (Infectious Pancreatic Necrosis Virus; IPNV) that affects salmonid fish reared in intensive culture systems [1,2]. IPN is considered one of the most important diseases in salmon aquaculture worldwide because it causes high mortality rates in first-feeding fry and in post-smolts shortly after transfer to seawater [3,4]. Additionally, survivor fish from an outbreak can become lifelong asymptomatic carriers of the virus, transmitting it

horizontally to other susceptible fish or vertically to their progeny; perpetuating the disease in the population [5]. In Chile, the second major producer and exporter of salmon worldwide [6], IPN is considered an endemic and prevalent disease, that affects mainly Atlantic salmon (*Salmon salar*) fry, producing great economic losses to the salmon farming industry [7,8]. To date, the isolates reported in the country have been classified within genogroups 1 and 5, that correspond to strains from Europe and North America, respectively [9-11]. Despite the high prevalence of the disease and the magnitude of its impact in salmon farming, there is not a specific health surveillance and control program in the country for IPN. It is only included in the general health program for fish, which establish the screening of breeders to identify possible IPNV carriers, with the consequent elimination of their ova, in an effort to prevent vertical transmission [12]. Consequently, rapid diagnostic methods for the control of IPN are needed that ought to be specific and accurate, to detect any possible variant of the virus from different sources (e.g. fish in different stages of growth and from both freshwater and marine farms), as well as highly sensitive to detect the low level virus present in asymptomatic carriers to screen valuable broodstock.

Traditionally, the diagnostic method recommended for IPN by the World Organization for Animal Health (OIE) in its Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals was the isolation of the virus in cell culture, followed by antibody-based identification of the agent [13]. Nevertheless, the chapter on IPN was last updated in 2003 without including any molecular methodology. Moreover, because the disease is considered enzootic in most of the regions where salmonid fish are cultivated is no longer considered in the OIE list, so it has been removed from the last editions of the manual (2009 and forward). Currently, several reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) based techniques have been described for the detection of IPNV [14-17], most of which use primers against the capsid protein of the virus (VP2). In Chile, it is well known that diagnostic laboratories use mostly real time RT-PCR (qRT-PCR) for routine diagnosis of IPN, because its application is simple, accurate and offers fast results. However, since there is no standardized methodology, laboratories use different in-house qRT-PCR procedures, with sets of primers and probes targeting different regions of the IPNV genome.

Inter laboratory comparison trials, or ring trials, are studies in which the performance (sensitivity, specificity, repeatability, reproducibility) of a diagnostic method is evaluated using identical samples in several laboratories, under control of a supervising laboratory. Ring trials are useful for validation of PCR based diagnostic methods, providing a way for the standardization and harmonization of assay protocols between laboratories [18]. Several ring tests have been carried out to evaluate the performance of different animal pathogen detection methods, as well as the technical competence of the participant laboratories [19-26]; however, at the moment of this study, there are no published reports of ring test for diagnostic assays of salmon viruses.

The Laboratory of Virology from the University of Valparaíso, as the National Reference Laboratory (NRL) for IPN in Chile [27], is responsible for the technical evaluation and standardization of diagnostic methods for the virus in the country. In this context, the NRL carried out the first inter laboratory comparison trial to evaluate the performance of the in-house qRT-PCR assays used by diagnostic laboratories in Chile to detect IPNV. This paper describes the development of the ring test carried out by the NRL, from the production of the samples, to

the evaluation of the laboratories that participated in the trial, assessing the sensitivity, specificity and repeatability of their methods. The aim of this study is to contribute in the standardization and validation of a reliable qRT-PCR protocol for the detection of IPNV that can be recommended for general use in Chile.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Participants*

Twelve diagnostic laboratories participated in the trial, their participation was a requirement to continue performing the diagnostic of the IPN disease under the Chilean National Fisheries and Aquaculture Service (SERNAPESCA) authorization. All of the laboratories remained anonymous to avoid any conflict between the participants. The laboratories used their own in-house methods for the detection of IPNV, a summary of the information provided by each one and their identification number is shown in Table 1. The NRL is listed with the number 13 and used two qRT-PCR assays during the trial.

### *2.2 Sample panel composition and distribution*

The sample panel was prepared entirely in the NRL and distributed to each participant laboratories. Set of 8 samples in culture media were prepared by triplicate. Each set consisted of 5 positive samples and 3 negative samples. The positive samples consisted in viral suspensions at different concentrations obtained from cell culture infected with two strains of IPNV. These strains belonged to genogroup 1, VR299 type strain (UV84 GenBank accession number HQ738519) and genogroup 5, Sp. type strain (ALKA3 GenBank accession number KF954912), and were isolated and sequenced in the NRL. The negative controls were culture media, cells in culture medium and a suspension of Infectious salmon anemia (ISA) virus (Table 2).

The positive samples were obtained by amplification of the IPNV strains in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) derived from *Oncorhynchus tshawytscha* embryonic tissue. Once a massive cytopathic effect (CPE) was observed, the cells were subjected to two cycles of freezing and thawing, and centrifuged at 3,000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were collected and serially diluted with L-15 (Leibovitz) culture medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone) and 50 µg mL<sup>-1</sup> gentamicin, to obtain the different concentrations of each viral strain.

The negative controls were prepared as follows: Atlantic salmon kidney (ASK) cells were infected with ISA virus, and once a CPE was observed, the same procedure described above was followed to harvest the viruses. In addition, CHSE-214 cells free of infection, were subjected to the same procedure. The third control was L-15 (Leibovitz) culture medium supplemented with FBS and gentamicin.

Aliquots of 0.5 mL of all negative and positive samples were distributed in centrifuge tubes and immediately stored at -20°C. Negative controls and positive samples, were produced and aliquoted in different days to avoid crossed contamination. Finally, all samples were encoded, to blind the trial, and sent refrigerated to each laboratory.

### 2.3 Results report

The information about the ring trial and specific instructions about reporting the results, were sent via email to all the laboratories two weeks in advance to provide enough time to answer any doubts about the trial. The sample panels were sent to each laboratory via courier and consisted in 3 set of 8 samples (24 samples in total), to analyze one set per day and thus to measure intra and inter laboratory repeatability.

Laboratories had to report the results for each sample set every day via email in a standard form given by the NRL.

Positive results for qRT-PCR assays were provided as Ct (cycle threshold), along with their replicates and standard deviation for each of the samples analyzed. Negative samples were informed with a negative sign or the Ct obtained, indicating the cut-off Ct determined by the laboratory.

### 2.4 Real-time RT-PCR assays

To perform the qRT-PCR analysis, the NRL used two previously standardized techniques [14], one targeting segment B of the virus (qRT-PCR VP1, Taqman chemistry) and other to segment A (qRT-PCR VP2, SYBR-Green). Briefly, 200  $\mu$ L were taken from each sample and viral RNA was extracted according to the manufacturer's instructions with E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Total RNA Kit I (Omega Bio-tek). The extracted RNA was eluted with molecular biology grade water and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Concentration and purity of the extracted total RNA was determined by measuring the absorbance ratio at 260 nm over 280 nm using a spectrophotometer (MaestroNano, Maestrogen). To ensure that contamination is strictly controlled during the RNA extraction process, a negative control using molecular biology grade water was always performed.

The extracted RNA was reverse transcribed and amplified by a one-step qRT-PCR using a 48-well plate real-time PCR system Step-One (Applied Biosystems). The two sets of primers and probe used by the NRL for the TaqMan<sup>TM</sup> and SYBR<sup>®</sup> green qRT-PCR assays are shown in Table 3.

The AgPath-ID<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems) was used for the amplification of the VP1 protein in segment B. This reaction was carried out in a 15  $\mu$ L reaction volume containing 7.5  $\mu$ L of RT-PCR Buffer (2X), 1.35  $\mu$ L of each forward and reverse primers (0.9  $\mu$ M), 0.3  $\mu$ L of the VP1 Taqman probe (0.2  $\mu$ M), 0.6  $\mu$ L of RT-PCR Enzyme Mix (25X) and 2  $\mu$ L of total RNA as template. The thermal profile used was  $48^{\circ}\text{C}$  for 10 min for reverse transcription, pre-denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and annealing/extension at  $59^{\circ}\text{C}$  for 45 s.

The amplification of the VP2 protein in segment B was carried out in a 15  $\mu$ L reaction volume containing 7.5  $\mu$ L of 2X Brilliant III Ultra-Fast SYBR<sup>®</sup> Green QRT-PCR Master Mix (Stratagene), 0.75  $\mu$ L of each forward and reverse primers (0.5  $\mu$ M), 0.8  $\mu$ L of RT/RNase block, 0.2  $\mu$ L of ROX (0.3  $\mu$ M) as passive reference and 2  $\mu$ L of total RNA as template. The thermal profile used was  $50^{\circ}\text{C}$  for 5 min for reverse transcription, pre-denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 s and annealing/extension at  $60^{\circ}\text{C}$  for 10 s. Finally, a melting curve analysis from  $70^{\circ}\text{C}$  to  $95^{\circ}\text{C}$  was performed.

The detection limit and the efficiency of the assays were evaluated using 10-fold dilutions of RNA extracted from the virus reference strain, UV84. The amplification efficiencies were 103%

for the qRT-PCR targeting segment B (Taqman) and 108% for the segment A qRT-PCR (SYBR green), both calculated with the formula  $[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$ . In addition, the cut off Ct values were 30.8 and 32.0, respectively.

All samples were analyzed in triplicate, and no-template controls (NTC), consisting in a reaction mixture without template, were used in all reactions, alongside with negative controls from the RNA extraction and positive controls from the virus reference strain.

The analysis of the samples was done twice: before the samples were sent to the laboratories (to confirm the expected results) and in parallel with the participant laboratories. The results of this latter analysis are the ones used in the inter laboratory comparison.

### *2.5 Analysis of the results*

The analysis of the results and the performance of the qRT-PCR assays for each laboratory were evaluated based on the methodology described by the OIE in the Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals [28]. Consequently, the sensitivity is defined as the proportion of positive IPNV samples that effectively tested positive in the assay and specificity is the proportion of negative samples for IPNV that effectively tested negative in the assay. In total, from the 24 samples sent to the laboratories, 15 samples were positives (contain viral suspensions of IPNV) and 9 were negatives (samples free of IPNV).

Repeatability (i.e. within-laboratory agreement between replicates) was evaluated in relation to the dispersion of the Ct values the three days of the trial for each positive sample. The distribution of the data was calculated around the mean values for each sample, using variance, standard deviation, standard error, and coefficient of variation. In addition, a box plot for the 5th and 95th percentiles was graphed to show the dispersion of the Ct values for each of the positive samples analyzed.

In order to compare and assess the agreement among the laboratories in-house methods, the Fleiss Kappa statistic from rating scores was calculated using the online computer program StatsToDo ([http://www.statstodo.com/CohenKappa\\_Pgm.php](http://www.statstodo.com/CohenKappa_Pgm.php)). The Kappa statistic is an index which compares the agreement against that which be expressed by chance. Considering the large dispersion of the data collected, Ct values were assigned to seven categories as follow: Ct  $\leq$  15 (+++++), Ct 15-20 (+++++), Ct 20-25 (++++), Ct 25-30 (+++), Ct 30-35 (++) , Ct  $\geq$  35 (+) and negative (-). The scale used to interpret the Kappa statistic was as follow: below 0.01 less than chance agreement, 0.01-0.20 slight agreement, 0.21-0.40 fair agreement, 0.41-0.60 moderate agreement, 0.61-0.80 substantial agreement and 0.81-0.99 indicate almost perfect agreement [29].

## **3. Results**

The results of the qRT-PCR assays from the different participating laboratories (laboratory identification number 1-12) were received mostly as expected, with the majority of the laboratories sending their results daily (starting one or two days after the samples were sent). Only one laboratory (N° 11) did not follow the instructions and sent the results with one week of delay. A summary of the results is shown in Table 4.

The majority of the laboratories detected as negative the true negatives samples i.e., with culture medium only (M03), culture medium with cells (M04) and the suspension with ISA virus (M05). Only laboratory N° 11 reported positive values for these 3 samples (i.e., false positives) the first day of the trial. The positive samples to IPN virus: M01, M02, M06 and M07 were interpreted as positive (i.e., true positives) by all laboratories. Only the positive sample, with the lower concentration of virus, M08, was reported as negative (i.e., false negative) (Lab N°4, day 1 and 3; Lab N° 11 day 2 and 3; Lab N°12 the three days of the trial) or too close to the cut-off Ct value for some laboratories (Lab N° 5, 6, 7 and 10).

Table 4 also shows the results of sensitivity and specificity calculated for each laboratory. Only 3 of the 12 laboratories showed values with less than 100% sensitivity and only one laboratory showed less than 100% specificity. Of the 3 laboratories that showed sensitivity problems (Labs N° 4, 11 and 12), and due to the report of 3 false negatives, laboratory N° 11 presented the lowest value (80%), in addition, it was the only one reporting 3 false positives reaching the lowest specificity (66.67%).

Intra laboratory repeatability for the qRT-PCR assays was evaluated in relation to the dispersion of the results (Ct values) reported by each laboratory over the three days of the trial. The Ct averages for each positive sample and their standard deviations are shown in Figure 1. Overall, a large variability was observed in terms of Ct range by each laboratory, which in some cases was almost 6 Cts of difference (Lab N° 11; Figure 1C). Laboratories N° 4, 10, 11 and the NRL, showed the greatest dispersion of data, with standard deviations near or greater than 2 Cts during the three days of the ring test. Note that Figure 1E shows no data for the laboratories N° 4 and 11, because they presented only one replicate out of three as positive for M08 sample during the whole trial, showing a major deficiency in their repeatability. The laboratory N° 12 (data not showed in Figure 1E), meanwhile, did not detect any of the replicas of the sample M08 analyzed as positive. Laboratories N° 1, 5 and 9 showed better repeatability, with standard deviations under 1 in most samples (Figure 1, A-E).

The overall dispersion of the results for the positive samples (i.e., M01, M02, M06, M07 and M08) was calculated with data from Table 4. This shows that each sample presented a wide dispersion of the Ct values obtained around the mean (data not shown), with samples M06 and M07, showing differences of up to about 17 Ct points between their lowest and the highest value. The dispersion measure, with percentiles for the Ct data provided by all laboratories for positive samples, was plotted, a high range in the Ct values was clearly seen (Figure 1F). This plot also shows that the mean Ct values of each sample are well correlated with the dilution of the samples, with significant differences between the largest (M01, M06) and lowest sample concentration (M02, M08) for each viral strain, respectively. Less dispersion of the data for the European type viral strain (genogroup 5) was found as well (Figure 1 F, samples M01 and M02). The Fleiss's Kappa analysis using seven categories indicated a moderate agreement among all the qRT-PCR in-house methods used, Kappa = 0.52 (95% CI = 0.50 to 0.54).

#### **4. Discussion**

According to the sanitary reports of Chilean salmon aquaculture, IPNV is one of the most detected pathogen of prevalent diseases in the country [30]. Diagnostic laboratories use mostly

qRT-PCR for routine diagnosis; however, unlike other viral diseases affecting salmon farming in the country (e.g Infectious Salmon Anemia, ISA), there is not a standard protocol officially recommended for qRT-PCR detection of IPNV. The technical norm for IPN only recommends the primers reported by Blake, Schill, McAllister, Lee, SingerNicholson [31] for conventional RT-PCR; mentioning that qRT-PCR in-house primers could be used prior validation or through internationally recognized bibliographic support [32]. Hence, as a first approach, the goal of the ring trial was to assess the efficiency of the in-house diagnostic techniques used by the laboratories in the country.

To our knowledge no ring test for IPNV detection has been previously published and this is the first report performed to compare the qRT-PCR in-house methods used by diagnostic laboratories in Chile.

In general, most of the laboratories obtained satisfactory results using their in-house methods in the ring trial, despite the differences in the platforms and the assay protocols used. Regarding this, it is important to emphasize that since the laboratories are private, and therefore not obligated to disclose details of the in-house methods, they only provided general information about the genomic target in their assays (e.i., protein VP1 or VP2), or no information at all.

Overall the ring trial showed high values of sensitivity and specificity, with 96.11% and 97.22% respectively. The only drawbacks observed in sensitivity among the laboratories involved the detection of the most diluted sample (M08, American strain UV84), reported as a false negative (Lab N° 4, 11 and 12) and with Cts close to the cut off value (Lab N° 5, 6, 7 and 10) by some laboratories. It is worth noting that, Laboratories 4 and 12 were the only ones that reported VP1 protein as genomic target, however their problems in sensitivity could not strictly be related to this since the NLR using the same protein as target had not problems in sensitivity and showed the lowest Ct values for M08. Overall, the results could be explained by methodological differences such as: unsuited primers, extraction methods and not fully optimized PCR systems. In addition, the experience of the operator may play an important role in the sensitivity of the diagnostic techniques as pointed out by other authors in inter-laboratory studies [19,24]. Although the extraction RNA method used might had played a role in the diagnostic performance of the test, this aspect was beyond the scope of this inter laboratory comparison.

Regarding the unsuitability of the primers, false negatives could be due to the lack of specificity of the primers to recognize a given genogroup, i.e; they might have been designed to detect the European IPNV strains which are the most prevalent in the country [11,33]. Hence, lower concentrations of American viral strains might not be detected by these primers. In addition, comparing the results of the European (M01, M02) and American samples (M06, M07) that are within the same dilution factor range, the former ones presented lower Ct variance results among the laboratories, showing a higher consistency for the detection of Sp type strains. Wernike, Bonilauri, Dauber, et al. [26] found that when comparing the detection of European genotypes for the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), inconsistencies were observed that were mainly explained by the large genetic diversity within the viral strains, which can be also observed when European and American IPNV Chilean strains are compared [11]. For the detection of classical swine fever virus (CSFV), Hoffmann, Blome, Bonilauri, et al. [34] also found that some in-house systems presented unspecific reactions or suboptimal sensitivity even with only a single CSFV genotype

It was recently shown that IPNV genomic variability also includes changes in the primer-target binding sites [35]; therefore, negative results must be carefully interpreted and private laboratories, as well, should take into account that hermeticism in-house methods has its own risks.

Only one laboratory had problems of specificity, reporting false positives during the first day of the trial. This is most likely a result of cross-contamination since the same laboratory tested negative the same sample in the following days of the ring trial. These kind of problems are not exceptional as have been reported in other ring trials [19,26,36] and should be addressed since could be potentially a hazard in routine diagnostics. Nonetheless, the laboratories that presented false negatives and positives had to repeat the ring test, improving their results to a 100% in sensitivity and specificity.

The level of agreement between Ct values of sample replicates (i.e., repeatability) for each laboratory, over the three days of the trial, was good, with coefficient of variations less than 10,8%. However, there was found a great variance for the Ct results when the same sample was compared among the laboratories. This was examined with the Kappa test, which showed only a moderate agreement inter laboratory results, which is understandable since every laboratory use their own in-house methods. It is expected that if the laboratories would use the same standard test for IPNV detection, the level of agreement would increase. This has been shown for other inter laboratory comparisons, in which it was possible to determine the reproducibility of a standard method [21]. It can be accepted that for practical and competitive reasons the laboratories use in-house methods; however, the significant differences found need to be addressed in order to allow harmonized diagnostic activity within the country. The OIE recommends the continue assessment of a validated assay to ensure the maintenance of its fitness, especially during routine use in the targeted population [28]. Complementary, ring trials to determine how the in-house techniques work, regarding the RNA extraction methods, should soon be done.

Finally, the inter laboratory comparison showed that laboratories achieved sensitivity and specificity but failed repeatability, therefore we recommend the use of an optimized and standardized method to ensure inter-laboratory reproducibility of the qRT-PCR detection of IPNV. The methods used by the NRL in this study could be used as a validated and reliable qRT-PCR protocol for the detection of IPNV for general use in Chile.

#### **Authors contributions**

- Proposed the theoretical frame: David Tapia, Yoanna Eissler, Juan Carlos Espinoza and Juan Kuznar
- Conceived and designed the experiments: David Tapia, Yoanna Eissler, Juan Carlos Espinoza
- Contributed reagents/materials/analysis tools: David Tapia, Yoanna Eissler, Juan Carlos Espinoza
- Wrote the paper: David Tapia, Yoanna Eissler and Juan Kuznar
- Performed the experiments: David Tapia and Juan Carlos Espinoza
- Analyzed the data: David Tapia and Yoanna Eissler

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura) and the private Laboratories that participated in the ring test.

## Financial support

Grants: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, SUBPESCA, R.EX N°1548, código 2013-32-17, "Identificación de cepas y nuevas variantes de IPNV y evaluación del impacto de éstas en atención a su distribución geográfica y características de cuadros clínicos" and FIPA N° 2014-60: "Determinación de factores epidemiológicos de riesgo en la presentación clínica de la enfermedad Necrosis Pancreática Infecciosa".

## Conflicting of interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## References

- [1] Dobos P. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Annual Review of Fish Diseases 1995; 5:25-54. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(95\)00003-8](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(95)00003-8).
- [2] Munro ES, Midtlyng PJ. Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. *In: Woo P. T. K. Bruno D. W. editors. Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections, 2nd Edition ed. CABI; 2011, p. 1-65.*
- [3] Jarp J, Gjevre AG, Olsen AB, Bruheim T. Risk-Factors for Furunculosis, Infectious Pancreatic Necrosis and Mortality in Post-Smolt of Atlantic Salmon, *Salmo-Salar L. J Fish Dis* 1995; 18:67-78. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb01267.x>.
- [4] Evensen Ø, Santi N. Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *In: Regenmortel Brian W. J. Mahy Marc H. V. Van editors. Encyclopedia of Virology (Third Edition). Oxford: Academic Press; 2008, p. 83-89* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00772-X>.
- [5] Bootland LM, Dobos P, Stevenson RM. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Dis Aquat Org* 1991; 10:13-21. <http://dx.doi.org/10.3354/dao010013>.
- [6] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Rome. 2016. <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>
- [7] Sernapesca: 2013, Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2012, ed. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura Sernapesca, pp. 1-30. [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8014](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=8014).
- [8] Sernapesca: 2007, Informe sanitario de la acuicultura en Chile año 2006, ed. Servicio Nacional de Pesca Sernapesca, pp. 1-18. [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=startdown&id=18690](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=18690).

- [9] Mutoloki S, Evensen O. Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of infectious pancreatic necrosis virus point towards a common origin. *J Gen Virol* 2011; 92:1721-1726. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.030270-0>.
- [10] Calleja F, Godoy MG, Cárcamo JG, Bandín I, Yáñez AJ, Dopazo CP, et al. Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with Universal Probe Library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. *J Virol Methods* 2012;183:80–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.03.022>.
- [11] Tapia D, Eissler Y, Torres P, Jorquera E, Espinoza J, Kuznar J. Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Dis Aquat Org* 2015; 116:173-184. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02912>.
- [12] Sernapesca: 2005, Programa de Vigilancia Epidemiológica, Norma Técnica Sección 2 ed. Pesca Servicio Nacional de, p. 60.
- [13] OIE: 2006, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals., ed. Health World Organization for Animal. Paris.
- [14] Eissler Y, Pavlov MS, Conejeros P, Espinoza JC, Kuznar J. Detection and quantification of Chilean strains of infectious pancreatic necrosis virus by real-time RT-PCR assays using segment B as a target. *Lat Am J Aquat Res* 2011; 39:9. <http://dx.doi.org/10.3856/vol39-issue3-fulltext-14>.
- [15] Bowers RM, Dhar AK. Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 2011; 25:60-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2010.12.002>.
- [16] Bowers RM, Lapatra SE, Dhar AK. Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J Virol Methods* 2008; 147:226-234. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.003>.
- [17] Ørpetveit I, Mikalsen AB, Sindre H, Evensen O, Dannevig BH, Midtlyng PJ. Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Subclinically Infected Atlantic Salmon by Virus Isolation in Cell Culture or Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: Influence of Sample Preservation and Storage. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22:886-895. <http://dx.doi.org/10.1177/104063871002200606>.
- [18] Malorny B, Tassios PT, Rådström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2003; 83:39-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00322-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00322-7).
- [19] van Maanen C, Wouda W, Schares G, von Blumröder D, Conraths FJ, Norton R, et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol* 2004; 126:351-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.016>.
- [20] Ferris NP, King DP, Reid SM, Hutchings GH, Shaw AE, Paton DJ, et al. Foot-and-mouth disease virus: A first inter-laboratory comparison trial to evaluate virus isolation and RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol* 2006; 117:130-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.001>.

- [21] Wang J, O'Keefe J, Orr D, Loth L, Banks M, Wakeley P, et al. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Vet Microbiol* 2008; 126:11-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.005>.
- [22] Batten CA, Bachanek-Bankowska K, Bin-Tarif A, Kgosana L, Swain AJ, Corteyn M, et al. Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol* 2008; 129:80-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.005>.
- [23] Jones RM, Hertwig S, Pitman J, Vipond R, Aspan A, Bolske G, et al. Interlaboratory comparison of real-time polymerase chain reaction methods to detect *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23:108-111,
- [24] Pol F, Le Dimna M, Le Potier MF. Five years' experience of classical swine fever polymerase chain reaction ring trials in France. *Rev Sci Tech* 2011; 30:797-807. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.30.3.2077>.
- [25] Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, et al. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods* 2011; 178:161-170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.007>.
- [26] Wernike K, Bonilauri P, Dauber M, Errington J, LeBlanc N, Revilla-Fernandez S, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24:855-866. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638712452724>.
- [27] Sernapesca: 2011, RES. EX. 1448, ed. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura Sernapesca, p. 3.
- [28] OIE: 2016, Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, ed. Health World Organisation for Animal. Paris. [http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre\\_validation\\_diagnostics\\_assays.htm](http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre_validation_diagnostics_assays.htm)
- [29] Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005; 37:360-363,
- [30] Sernapesca: 2016, Informe sanitario de salmonicultura en centros marinos año 2015, ed. Sernapesca, p. 35. [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=startdo wn&id=14754](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdo wn&id=14754).
- [31] Blake SL, Schill WB, McAllister PE, Lee MK, Singer JT, Nicholson BL. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33:835-839, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790447>
- [32] Sernapesca: 2012, Pruebas diagnósticas para enfermedades de los peces. Norma Técnica N°2, ed. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura Sernapesca, p. 18. [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com\\_remository&Itemid=246&func=startdo wn&id=3862](http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdo wn&id=3862).

- [33] Torres P, Eissler Y, Tapia D, Espinoza JC, Kuznar J. Genotipificación y relación hospedador-específica del virus de la necrosis pancreática infecciosa en Chile. *Lat Am J Aquat Res* 2016; 44:860-868. <http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue4-fulltext-23>
- [34] Hoffmann B, Blome S, Bonilauri P, Fernandez-Pinero J, Greiser-Wilke I, Haegeman A, et al. Classical swine fever virus detection: results of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction ring trial conducted in the framework of the European network of excellence for epizootic disease diagnosis and control. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23:999-1004. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638711416849>.
- [35] Jorquera E, Morales P, Tapia D, Torres P, Eissler Y, Espinoza JC, et al. Chilean IPNV isolates: Robustness analysis of PCR detection. *Electron J Biotechnol* 2016; 20:28-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.01.001>.
- [36] Paton DJ, McGoldrick A, Belak S, Mittelholzer C, Koenen F, Vanderhallen H, et al. Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol* 2000; 73:159-174. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00142-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00142-5).

Table 1: Information of the qRT-PCR methods used by the laboratories.

Laboratory	Detection Chemistry	Real Time RT-PCR Platform	Genomic Target
1	Taqman	MX3000P, Stratagene	VP2 Protein
2	Taqman	MX3000P, Stratagene	VP2 Protein
3	Taqman	MX3000P, Stratagene	VP2 Protein
4	Taqman	StepOne Plus, Applied Biosystems	VP1 Protein
5	Taqman	StepOne Plus, Applied Biosystems	VP2 Protein
6	Taqman	StepOne Plus, Applied Biosystems	VP2 Protein
7	Taqman	LightCycler 480 II, Roche	VP2 Protein
8	Taqman	LightCycler 480 II, Roche	VP2 Protein
9	Taqman	StepOne Plus, Applied Biosystems	Not informed
10	Taqman	LightCycler 480 II, Roche	Not informed
11	Taqman	MX3000P, Stratagene	Not informed
12	Taqman	MX3000P, Stratagene	VP1 Protein
13	Taqman & SYBR	StepOne Plus, Applied Biosystems	VP1 & VP2 Proteins

Table 2: Samples included in the ring test.

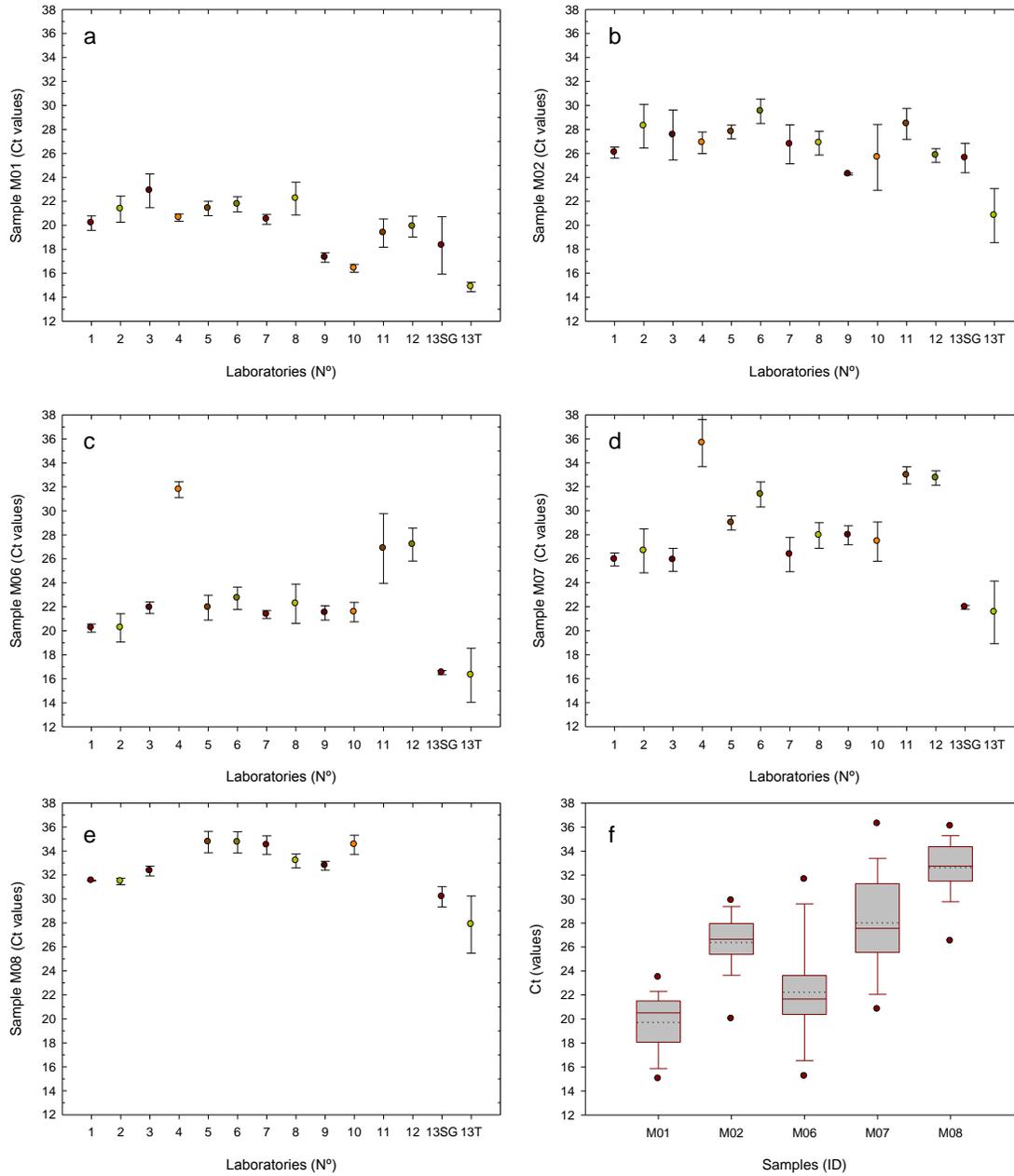
Sample ID	Type of sample	Expected result
M01	IPNV genogroup 5	Positive
M02	IPNV genogroup 5 dilution 10 <sup>-2</sup>	Positive
M03	L-15 Cell culture medium	Negative
M04	CHSE-214 cells in culture medium	Negative
M05	ISAV	Negative
M06	IPNV genogroup 1	Positive
M07	IPNV genogroup 1 dilution 10 <sup>-2</sup>	Positive
M08	IPNV genogroup 1 dilution 10 <sup>-4</sup>	Positive

Table 3: NRL primers and probe used for the qRT-PCR assays.

Primers/Probe	Name	Sequence	Amplicon position	Coding region
TaqMan				
Probe	IPNV VP1	56FAM-TACATAGGC-ZEN-AAAACCAAAGGAGACAC-3IABkFQ	Segment B: 668-820	VP1
Forward primer	VP1F	GTTGATMMASTACACCGGAG		
Reverse primer	VP1R	AGGTCHCKTATGAAGGAGTC		
SYBR-Green				
Forward primer	WB1	CCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGC	Segment A: 20-225	VP2
Reverse primer	WB2	CGTCTGGTTCAGATTCCACCTGTAGTG		

Table 4: Results of the mean threshold cycle values during the three days of the ring trial.

Day	Sample	Expected results	Laboratories													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13SG*	13T*
1	M01	+	19.7	20.1	22.7	20.8	21.5	22.3	20.8	20.9	17.7	16.3	18.2	20.7	18.7	14.4
	M02	+	25.7	26.2	28.6	25.9	27.3	29.8	27.8	25.8	24.3	26.5	28.1	26.5	26.7	19.5
	M03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34.8	-	-	-
	M04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33.3	-	-	-
	M05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35.1	-	-	-
	M06	+	19.9	19.6	22.0	31.7	22.3	23.7	21.7	20.4	21.0	20.8	24.7	28.3	16.5	15.0
	M07	+	25.4	25.0	25.7	36.7	29.5	31.0	27.1	27.4	27.3	27.9	32.2	33.4	22.0	19.5
	M08	+	31.5	31.2	32.7	-	35.8	34.5	34.9	33.7	32.5	35.0	33.9	-	29.4	26.5
2	M01	+	20.0	22.0	24.4	20.9	22.0	21.8	20.0	22.2	16.9	16.2	20.5	20.1	15.7	15.2
	M02	+	25.9	29.5	28.9	27.7	28.4	30.4	24.9	27.0	24.3	22.6	29.9	25.5	24.3	23.4
	M03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M06	+	20.5	19.6	21.4	32.4	22.8	21.9	21.1	22.8	21.3	22.4	30.2	25.7	16.4	18.9
	M07	+	25.9	26.4	26.9	36.8	28.3	32.5	24.7	27.3	27.7	25.6	33.1	32.5	22.1	24.5
	M08	+	31.5	31.5	32.3	37.3	34.1	35.7	33.6	32.6	33.2	35.0	-	-	30.0	30.6
3	M01	+	20.9	22.0	21.6	20.3	20.8	21.1	20.6	23.6	17.3	16.8	19.4	18.9	20.5	15.0
	M02	+	26.6	29.2	25.1	27.0	27.7	28.4	27.6	27.7	24.2	27.9	27.4	25.5	25.8	19.5
	M03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M06	+	20.3	21.6	22.4	31.1	20.8	22.5	21.2	23.6	22.2	21.5	25.8	27.6	16.7	15.0
	M07	+	26.5	28.6	25.0	33.4	29.1	30.5	27.3	29.2	28.8	28.8	33.6	32.3	21.8	20.6
	M08	+	31.6	31.7	31.9	-	34.4	34.0	35.0	33.3	32.7	33.6	-	-	31.1	26.5
True Positive (TP)			15	15	15	13	15	15	15	15	15	15	13	12	15	15
False Positive (FP)			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
True Negative (TN)			9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	6	9	9	9
False Negative (FN)			0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0
Sensitivity %			100	100	100	86.7	100	100	100	100	100	100	86.7	80	100	100
Specificity %			100	100	100	100	100	100	100	100	100	66.7	100	100	100	100



**Figure 1.** Mean Ct values reported by each laboratory (M01, M02, M06, M07, M08, panels A-E, respectively), error bars = standard deviation. Box plot of the 5th and 95th percentiles, black dots represent the minimum and maximum Ct values and the dotted line the mean per sample.