

revista versión[®] diferente **Salmón-Acuícola**



PRV EN SALMÓNIDOS *** BENEFICIOS DE HARINA DE KRILL EN SALMÓNIDOS *** ESTUDIO "RENIBACTERIUM SALMONINARUM" *** NUEVA VACUNA BEKA-VAX® *** IPNV *** PROGRAMA PTEC-INVA *** NUEVO LECTOR DIGITAL DETECCIÓN BIOTOXINAS MARINAS *** PROYECTO TECNOLÓGICO CULTIVO LARVAL *** SITUACIÓN DE PESQUERÍAS CHILENAS Y PELÁRGICAS POR CAMBIO CLIMÁTICO *** EVALUACIÓN DE PREFACTIBILIDAD ECONÓMICA CULTIVO Y SECADO HUIRO FLOTADOR CON TECNOLOGÍA BIVALNET



Distribución Gratuita Consérvela



AquaBC

Experiencia a su servicio

Somos expertos en soluciones integrales en monitoreo ambiental y detección de floraciones algales nocivas (marea roja).



Venta, mantención y reparación de microscopios.



Ofrecemos equipamiento completo de alta calidad y durabilidad, para centros de cultivo y wellboats.



Consultoría en reducción de riesgos ambientales, monitoreo y manejo de floraciones algales en acuicultura.

<https://www.aquabc.cl>



Año 20 - N°36
Edición Especial
Semestral 2023

Distribución Gratuita a nivel nacional
Semestral - 3.000 unidades

Editores

Opción Comunicaciones
Cel: +56 9 9443 3504
richardaraya@opcionaraya.cl

Diseño y Diagramación

Lucía Zúñiga Fuentes
luciazunigaf@gmail.com

Fotografías Portada

Gentileza de:

- David Cassis, AquaBC
- Fernando Valenzuela, UA
- Eleuterio Yáñez, PUCV
- Daniel Nieto, Salmón Sustentable
- Sandra Bravo, UACH
- Christian Díaz, UCSC
- Rubén Avendaño, UNAB
- Gabriela Squella, Vehice
- Pamela López, Veterquímica

Revista "Versión Diferente", es un medio de comunicación independiente creado y editado por Opción Comunicaciones. Queda prohibida la reproducción de todo el contenido sin previa autorización de sus editores, así mismo como la reproducción total o parcial de los anuncios publicitarios firmados por Opción Comunicaciones.

Los contenidos y opiniones que aparecen en esta publicación son de exclusiva responsabilidad de las empresas o personas que las emiten, y no necesariamente los editores comparten los conceptos aquí mencionados.

Una Producción de:

opción[®]
COMUNICACIONES

SU MEJOR OPCION EN PUBLICIDAD

Porque somos diferentes,
publique con nosotros

Cel: +56 9 9443 3504
richardaraya@opcionaraya.cl

Avisadores

VeHiCe	7
Terminoindustrial	15
Copec	21
Univ. de los Lagos	26
Santa Adriana	32
Plásticos Austral	33
OTAQ	47
7 Plagas	51
AquaBC	T2
Opción Comunicaciones	T3
Veterquímica	T4

Contenidos

Indice de Universidades	2
Editorial	3
Fases Lunares	4
Ferias Acuícolas	5
Ferriados Internacionales	6
<i>Piscine orthoreovirus (PRV) en salmónidos</i>	8
Desempeño en campo de BEKA-VAX®, una nueva vacuna contra <i>Renibacterium salmoninarum</i>	27
Salmón Magallánico, navegando hacia la sostenibilidad	38
PTEC-INVA: Uniendo a dos de los principales sectores productivos de Chile	42
Nuevo lector digital para obtención de resultados semicuantitativos utilizando tests rápidos para detección de biotoxinas marinas	48
¿Por qué desarrollar un software en mi empresa?	63

Índice de Universidades SUS ESTUDIOS E INVESTIGACIONES

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Beneficios de la harina de Krill en la producción de Salmónidos

16

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Hierro y vesículas de membrana de *Renibacterium salmoninarum*:
Estudio de su rol en la patogenicidad de salmón del Atlántico.

22

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV):
Explorando estrategias para identificar nuevas proteínas virales inmunogénicas para la producción de vacunas (o como adelantarse a las amenazas de un virus RNA)

34

UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA

Innovación tecnológica para la utilización de servicios ecosistémicos para el cultivo larval de nuevas especies de interés para la acuicultura de pequeña escala.

52

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

Situación de principales pesquerías chilenas y proyecciones de pesquerías pelágicas con el cambio climático

56

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

Evaluación de prefactibilidad económica del cultivo y secado de huiro flotador (*Macrocystis pyrifera*) con tecnología BIVALNET®

60

Editorial

Para el año 2023, seguimos en el camino de buscar temas o artículos relevantes en materia de: enfermedades virales y bacteriales en peces, alimentos en base a harinas de Krill, pescado y vegetales para salmónidos. Además de tecnologías nuevas para detección de biotoxinas marinas, estadística sobre principales pesquerías chilenas y sus proyecciones de pesquerías pelágicas con el cambio climático y por último nuevas vacunas para salmónidos.

Sin embargo, logramos reunir información relevante en temas salmón-acuícolas, acuicultura y pesquerías que son de gran interés para nuestros lectores.

Esperamos que en esta primera edición digital e impresa 2023, la revista pueda ser vista por un mayor número de personas que consideren un aporte en materia de investigación y tecnología en el ámbito salmónero-acuícola, acuicultura y pesquera de país.

Queremos dar un especial agradecimiento a todos nuestros colaboradores e investigadores académicos que hacen un aporte con artículos científicos de extensión de proyectos en ejecución en materias como: biotecnología, patologías, nutrición, genética, medio ambiental, normativas, tecnología y muchos otros temas de interés que consolidan la revista "Versión Diferente" como un medio escrito científico de extensión de consulta diaria.

Continuamos en la búsqueda de información técnica relevante en materia de investigación para la industria salmón-acuícola, mitilicultora y pesquera de Chile. Siendo algunos de los temas a tratar para esta primera edición 2023:

"Piscine Orthoreovirus en Salmónidos (PRV); "Beneficios de la Harina de Krill en la Producción de Salmónidos"; " Hierro y Vesículas de membrana de *Renibacterium Salmoninarum*"; "Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV); "Desempeño en campo de BEKA-VAX una nueva vacuna contra *Renibacterium Salmoninarum*";











"Nuevo Lector Digital Test Rápidos para detección de Biotoxinas Marinas"; "Innovación Tecnológica Servicios Ecosistémicos para el cultivo larval de nuevas especies de interés para la acuicultura de pequeña escala"; "Situación de principales Pesquerías Chilenas y Proyecciones de Pesquerías Pelágicas con Cambio Climático"; "PTEC-INVA: Uniendo a dos de los principales sectores productivos de Chile"; "Tecnología del Cultivo y Secado de Huiro Flotador (*Macrocystis Pyrifera*) con Tecnología BIVALNET"; "¿Por qué desarrollar un Software en mi empresa".

Continuamos manteniendo el cambio de fecha de cada edición semestral debido a circunstancias externas ajena a nuestra agenda de tiempo editorial para impresión.

Los invitamos a participar en próxima edición digital e impresa Diciembre 2023.

Richard Araya Véliz
Gerente Comercial
Revista Versión Diferente

Fases Lunares

	 NUEVA	 CRECIENTE	 LLENA	 MENGUANTE
 JULIO	17	25	3	10
 AGOSTO	16	24	1/31	8
 SEPTIEMBRE	15	22	29	6
 OCTUBRE	14	22	28	6
 NOVIEMBRE	13	20	27	5
 DICIEMBRE	12	19	26	5

* Si necesita información de Mareas y Lunas solicitarlas directamente a www.shoa.cl o serviciosaterceros@shoa.cl



2° Semestre 2023

Ferias Internacionales

JULIO

05 al 08	AQUACULTURE	Manila - Filipinas
10 al 12	AQUAFARM	Melbournne - Australia

AGOSTO

31 al 02	TAIWAN FISHERY AND SEAFOOD SHOW AQUAFARM	Taipei - Taiwán
03 al 06	TAEX – THE AQUACULTURE EXPO	India - Noida
22 al 24	AQUANOR	Trondheim - Noruega
23 al 25	AQUACULTURE SEAFOOD; TECNOLOGY EXPO	Tokio - Japón
23 al 25	VIET FISH - FISHERIES INTERNATIONAL EXHIBITION	Vietnam - Asia
23 al 26	WORLD SEAFOOD SHANGHAI + SIFSE	Shanghai - China

SEPTIEMBRE

06 al 08	SEAFOOD LIMA – EXPO PESCA; ACUIPERU	Lima - Perú
11 al 13	SEAFOOD EXPO ASIA	Singapur
15 al 17	INTERNATIONAL FISHERY; SEAFOOD EXPO	China
18 al 21	AQUACULTURE EUROPE	Viena - Austria
25 al 27	WORLD SEAFOOD CONGRESS	Perinche - Portugal
27 al 29	GLOBAL FISHERY FORUM; SEAFOOD EXPO	St. Peterburgo - Rusia

OCTUBRE

03 al 05	CONXE MAR	Vigo - España
10 al 13	DANFISH INTERNATIONAL	Aalborg - Dinamarca
23 al 26	SAUDI AQUACULTURE TRADE FAIR FOR AQUACULTURE	Saudi
23 al 26	AQUA EXPO GUAYAQUIL	Guayaquil - Ecuador
24 al 26	THE 10 th INTERNATIONAL CONFERENCE ON FISHERIES AND AQUACULTURE	Bali - Indonesia
25 al 27	CHINA FISHERIES; SEAFOOD EXPO	Qingdao - China

NOVIEMBRE

01 al 03	BISFE BUSAN INTERNATIONAL SEAFOOD; FISHERIES EXPO2023	Busan - Corea del Sur
01 al 03	AQUACULTURE TAIWAN EXPO; FORUM	Taiwan
08 al 12	SEAFOOD SHOW ASIA	Yakarta - Indonesia
13 al 16	AQUACULTURE AFRICA	Lusaka - Zambia
14 al 17	FENDCAM 2023	Madrid - España
15	INTERNATIONAL CONFERENCE ON FISHERIES AND AQUACULTURE (ICFA)	Reykjavik - Islandia

DICIEMBRE

07 al 09	GLOBAL FISHERY FORUM; SEAFOOD EXPO FISH	Estambul - Turquía
07 al 09	SEAFOOD EXPO EURASIA – TUYAP FAIR AND CONGRESS CENTER	Estambul - Turquía

MARZO 2024

19 al 21	AQUASUR 2024	Puerto Montt - Chile
----------	--------------	----------------------

Feriados Internacionales

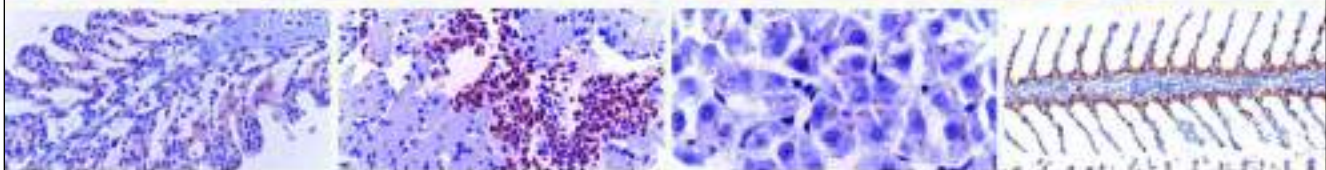
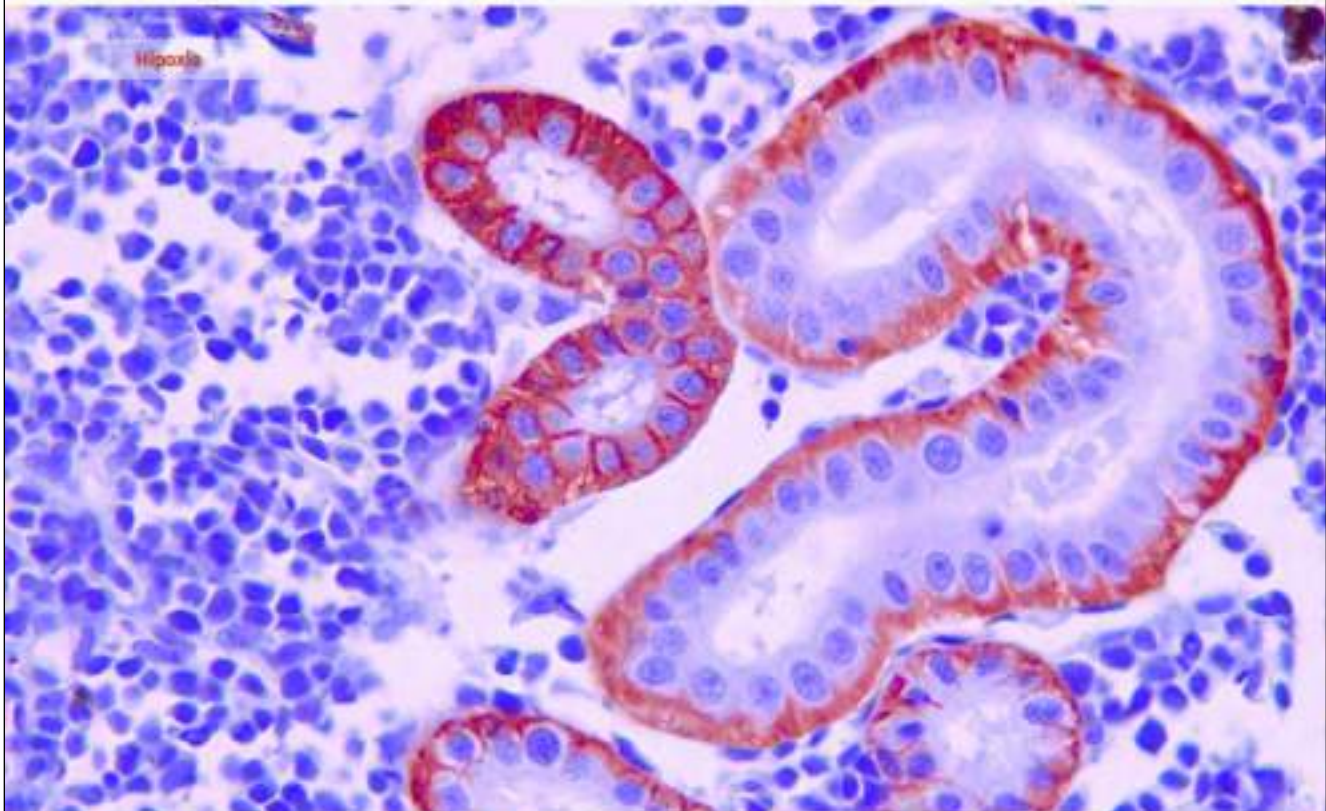


Domingo 1 Enero	Día de Año Nuevo	●	●	●	●	●	●
Martes 9 Enero	Día de la Entrada a la Edad adulta					●	
Lunes 16 Enero	Día de Martin Luther King			●			
Lunes 7 Febrero	Día de la Constitución		●				
Sábado 11 Febrero	Día de la Fundación					●	
Lunes 20 Febrero	Día de Los Presidentes			●			
Martes 21 Marzo	Inicio Equinoccio Primavera					●	
Jueves 6 Abril	Jueves Santo					●	
Viernes 7 Abril	Viernes Santo	●	●	●			●
Lunes 18 Abril	Lunes de Pascua						●
Sábado 29 Abril	Día de Emperador Showa					●	
Lunes 1 Mayo	Día Internacional del Trabajo	●				●	
Lunes 1 Mayo	Día Festivo de principio de mayo						●
Miércoles 17 Mayo	Día de la Constitución					●	
Jueves 18 Mayo	Día de la Ascensión					●	
Domingo 28 Mayo	Día de las Glorias Navales	●					
Lunes 29 Mayo	Día de la Reina		●				
Domingo 28 Mayo	Domingo de Pentecostés					●	
Lunes 29 Mayo	Día de los caídos en la Guerra			●			
Lunes 29 Mayo	Día Festivo de Primavera						●
Lunes 26 Junio	Día de San Pedro y San Pablo	●					
Sábado 1 Julio	Día de Cánada		●				
Martes 4 Julio	Día de la Independencia			●			
Domingo 16 Julio	Día de la Virgen del Carmen	●					
Lunes 17 Julio	Día del Mar					●	
Lunes 7 Agosto	Fiesta del Verano						●
Viernes 11 Agosto	Día de la Montaña					●	
Martes 15 Agosto	Día de la Ascensión de la Virgen	●					
Lunes 4 Septiembre	Día del Trabajo		●	●			
Lunes 18 Septiembre	Día de la Independencia	●					
Martes 19 Septiembre	Día de las Glorias del Ejército	●					
Martes 19 Septiembre	Homenaje a las personas mayores					●	
Sábado 23 Septiembre	Equinoccio de Otoño					●	
Lunes 9 Octubre	Día del Encuentro de Dos Mundos	●		●			
Lunes 9 Octubre	Día de Acción de Gracias		●				
Martes 10 Octubre	Día de la Salud y los Deportes					●	
Viernes 27 Octubre	Día de las Iglesias Protestantes y Evan.	●					
Miércoles 1 Noviembre	Día de Todos los Santos	●					
Viernes 3 Noviembre	Día de la Cultura					●	
Sábado 11 Noviembre	Día del Recuerdo		●				
Viernes 10 Noviembre	Día de Los Veteranos de Guerra			●			
Jueves 23 Noviembre	Día de Acción de Gracias al trabajo					●	
Jueves 23 Noviembre	Día de Acción de Gracias			●			
Jueves 30 Noviembre	Fiesta de San Andrés						●
Viernes 8 Diciembre	Inmaculada Concepción	●					
Lunes 25 Diciembre	Navidad	●	●	●	●		●
Martes 26 Diciembre	Día de San Esteban				●		●

DESCUBRE EL FUTURO DE LA HISTOPATOLOGÍA

Marcadores fisiológicos

En nuestro laboratorio, gracias al nuevo desarrollo de marcadores fisiológicos de inmunohistoquímica, estamos llevando la industria salmonera hacia nuevas fronteras de diagnóstico.



Intoxicación por nitritos

Transporte de O₂

Intoxicación por metales

Estatus de smoltificación

- Visualiza procesos fisiológicos clave
- Detecta enfermedades y procesos tóxicos tempranamente

- Monitorea la salud de tus salmones



Contacto: +56 9 3910 7937 - info@vehice.com



www.vehice.com

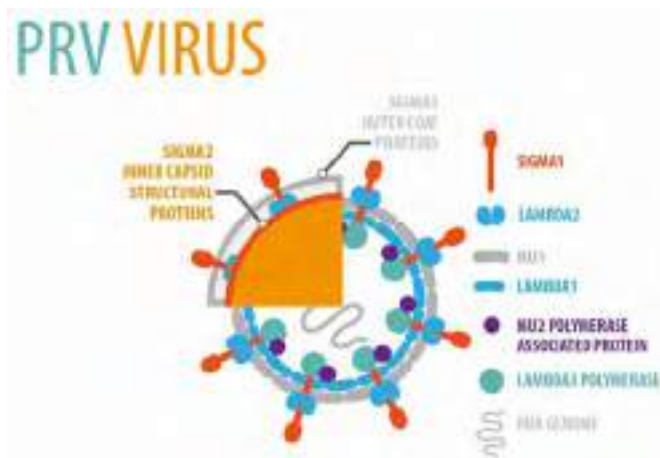
Piscine orthoreovirus (PRV) en salmónidos



Autores: Carlos Sandoval, Marcelo Vera, Karina Carrasco, Denis Cárdenas, Gabriela Squella.

Introducción

Piscine orthoreovirus (PRV) es un virus ARN, bicatenario, no envuelto, icosaédrico, con un tamaño aproximado de 60 a 85 nm (Nibert, 1998). Su genoma está encapsulado por una cubierta de proteína interna y otra externa, la cual comprende 8 proteínas codificadas por virus diferentes.



Esquema 1: Estructura viral de *Piscine orthoreovirus*

El PRV está asociado con la enfermedad conocida como *Heart and Skeletal Muscle Inflammation* (HSMI), que afecta principalmente a los salmones de cultivo y se caracteriza por la inflamación del tejido cardíaco y muscular esquelético (Kongtorp *et al.*, 2004).

En cuanto a su distribución, se ha observado en Noruega, Canadá, Alemania, Escocia, Islandia, Japón y Chile.

Recientemente, se sugirió que el subgenotipo Ib de PRV-1 puede ser responsable de HSMI en el salmón del Atlántico (Godoy *et al.*, 2021), mientras que el subgenotipo Ia se asoció con una baja virulencia (Dhamotharan *et al.*, 2019, Godoy *et al.*, 2021).

En cuanto a PRV-3, este induce una enfermedad similar, pero no idéntica, a HSMI en trucha arcoíris y salmón coho en Chile.

Por otro lado, PRV-2 es un virus que se encuentra solo en el salmón Coho en Japón (no asociado a signología de HSMI).

En Chile, recientemente se ha estudiado la ocurrencia de PRV en diferentes especies de salmónidos de cultivo. Tanto PRV-1 como PRV-3 se han detectado en salmón del Atlántico con HSMI, salmón Coho con enfermedad similar a HSMI y trucha arcoíris con Síndrome Idiopático de trucha arcoíris (ISRT) (Bustos, *et al.*, 2011; Cartagena *et al.*, 2018; Godoy, *et al.*, 2016; Morton, *et al.*, 2017).

De esta manera, los hallazgos indican que las infecciones por PRV (excepto por PRV-2) se han detectado en las tres principales especies de salmónidos de cultivo en nuestro país.

Patogénesis

• Células target

Los eritrocitos son las principales células diana de infección del PRV y durante la fase peak de la infección (máxima) más del 50 % de estas células pueden infectarse.

Luego de infectar y replicarse en los eritrocitos circulantes, la infección se disemina hacia miocitos del corazón y músculo esquelético (Finstad *et al.*, 2014).

• Transmisión

Los principales sitios de entrada del virus son las superficies epiteliales como branquias, piel, base de aletas e intestino (Secombes *et al.*, 2012).

Un estudio realizado por Løvoll *et al.*, 2012 demostró que los **huevos de reproductores positivos** para PRV resultaron negativos para PRV en condiciones de incubación comercial, lo cual indicaría que la transferencia vertical no es considerada una ruta relevante de transmisión.

En otro estudio, se descubrió que PRV se excreta a través de las heces, siendo esta una posible vía de transmisión del virus (Hauge *et al.*, 2016).

- **Replicación intracelular en eritrocito**

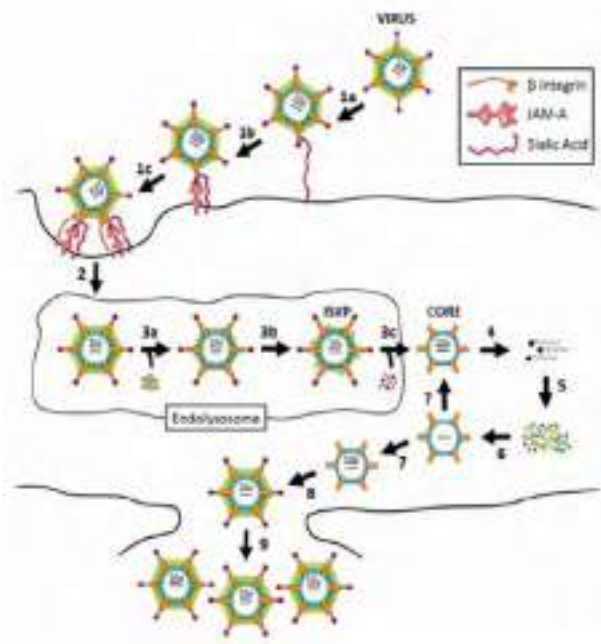


Figura 1: Replicación intracelular de PRV en eritrocitos (Mohamed *et al.*, 2015).

- (1) La unión celular es mediada por receptores: (1a) unión de ácido siálico, (1b) asociación JAM-A y (1c) unión de integrina.
- (2) Se internaliza por endocitosis a endosomas/lisosomas tardíos.
- (3) Desensambaje viral a través de (3a) eliminación de $\sigma 3$ mediada por proteolíticos, (3b) escisión de $\mu 1$ a σ , y (3c) pérdida de $\sigma 1$ concomitante con una penetración de la membrana. El virus al interior de la célula libera factores para producir más partículas virales.
- (4) Transcripción de ARN virales y liberación mediante partículas centrales citoplasmáticas.
- (5) Expresión de las proteínas de PRV.
- (6) Las proteínas virales se ensamblan con el ARN viral, dando lugar al viroplasma* (7) (Figura 10 y 11), una zona en donde se concentra la mayor cantidad de proteínas virales (8).
- (9) Los nuevos virus producidos son liberados, los cuales tienen la capacidad de infectar a otras células (Mohamed *et al.*, 2015).

*Los viroplasmos o inclusiones intracelulares es donde se produce la replicación, empaquetamiento y el ensamblaje de nuevas partículas virales (Novoa *et al.*, 2005). Estas inclusiones virales requieren la reubicación de los organelos, la reorganización de las membranas celulares y cambios en la distribución y dinámica del citoesqueleto de la célula (Netherton *et al.*, 2007).

Fases de diseminación del virus

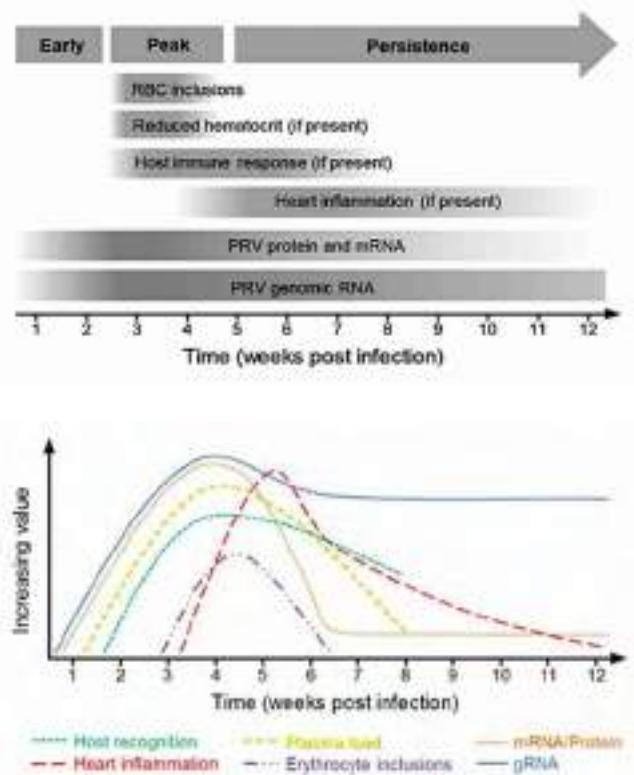


Figura 2: Fases de diseminación de PRV (Polinski *et al.*, 2020).

- **Fase Temprana**

Entrada inicial al huésped, replicación y diseminación del virus en las células sanguíneas (suele durar 2 - 3 semanas a 12°C). La fase replicativa temprana probablemente dicta la cantidad de virus que es difundido, estableciendo el curso y la gravedad general de la infección (Lai, Mainou, Kim y Dermody, 2013).

- **Fase Máxima**

Suele durar 2-3 semanas a 12°C. Ocurre una lisis eritrocitaria después de alcanzar la carga máxima de replicación de ARN viral, junto con la formación de inclusiones virales intracitoplásmicas. En esta fase el PRV se puede replicar en más del 50% de las células sanguíneas (Finstad *et al.* 2014), alcanzando las cargas sanguíneas sistémicas más altas de PRV (Dahle *et al.*, 2015).

- **Fase Persistente**

Se produce una marcada reducción en la producción de proteínas virales. Al final de esta etapa, los signos clínicos desaparecen y el virus se vuelve persistente. (Haatveit *et al.*, 2017).

Signología Clínica

- **HSMI en *S. salar***

La enfermedad HSMI solo afecta a *S. salar* y los brotes aparecen principalmente entre 4 a 9 meses después de la transferencia al agua marina (Noruega), aunque también se ha descrito a los 14 días de la transferencia al agua de mar (Kongtorp *et al.*, 2004) y en Chile se puede encontrar en fase de agua dulce y mar. Los signos clínicos de la enfermedad pueden surgir durante el peak de la fase aguda, pero generalmente se observan en las primeras etapas de la fase persistente (Polinski *et al.*, 2019, Vendramin *et al.*, 2019, Wessel *et al.*, 2017). En condiciones de cultivo, la mortalidad de los peces infectados suele ser baja pero podría llegar hasta un 20% de las jaulas infectadas (Kongtorp *et al.*, 2004).

Los signos macroscópicos incluyen: corazón pálido, hemorragia pericárdica, ascitis e hígado pálido (los niveles de hematocrito suelen ser normales). Ocasionalmente, se encuentran lesiones en hígado, bazo, branquias y riñones, pero las principales lesiones histopatológicas se encuentran en corazón y músculo esquelético.

- **Síndrome Ictérico en *O. kisutch***

El Síndrome Ictérico del Salmón Coho (Ictericia) se caracteriza por producir brotes durante la temporada de otoño. Los peces en etapa de agua de mar presentan signos clínicos que incluyen: ictericia, anemia, ascitis, palidez de branquias e hígado, aletas hemorrágicas en la base, exoftalmía bilateral, acumulación de grasa visceral, bazo oscuro, hidropericardio y ventrículo cubierto por una capa de grasa. Además, estudios hematológicos presentan hematocrito y concentración de hemoglobina (Hb) bajos (anemia severa).

Actualmente, se desconoce el agente etiológico causante de este síndrome, sin embargo, los ensayos experimentales de infección realizados por Smith, *et al.* (2006), reveló dos hallazgos importantes: 1) la condición icterica fue causada por una forma infecciosa de anemia hemolítica, asociado probablemente a una etiología viral; 2) la enfermedad se reprodujo en salmón Coho (*O. kisutch*) pero no en salmón del Atlántico (*S. salar*) ni en trucha arcoíris (*O. mykiss*).

De acuerdo con Cartagena *et al.*, 2020, las secuencias PRV-1 y PRV-3 se detectaron simultáneamente en los mismos especímenes de salmón Coho de cultivo con ictericia en Chile, y están relacionadas con secuencias de PRV previamente identificadas en salmón del Atlántico, salmón Coho, trucha café y trucha arcoíris. Además, las secuencias encontradas se agruparon con secuencias de aislamientos de PRV-1 pertenecientes al Sub-genotipo Ib o con secuencias de PRV-3 del Genotipo II. En concreto, se agruparon junto con el PRV-3 descrito en trucha arcoíris (PRV-3a) por Dhamotharan *et al.* (2018).

Hasta el momento, los resultados no pueden establecer si PRV-1b y/o PRV-3b es el agente etiológico del Síndrome de Ictericia en el salmón Coho, y se necesitan más estudios (infección experimental) para determinar si alguno de esos PRV está directamente asociado con este síndrome, sin embargo, hay evidencia apuntando en esa dirección.

De confirmarse esta hipótesis, podría ser un nuevo ejemplo de enfermedad de salmónidos causada por PRV en Chile, y específicamente, en salmón Coho podría ser la segunda enfermedad reportada después de la condición similar a HSMI (no Síndrome de Ictericia) descrita por Godoy, *et al.* (2016). Es importante considerar que las mortalidades asociadas a este síndrome han ido en aumento en los últimos años, alcanzando hasta un 71% de las mortalidades acumuladas en 2019 (SERNAPESCA, 2019).

- **HSMI-like en *O. kisutch***

En el Salmón Coho, las lesiones más comunes relacionadas con la enfermedad HSMI-like son el hígado con una tonalidad amarillenta, hemopericardio, corazón pálido, colestasis biliar, ascitis y sangre coagulada en la cavidad abdominal. La principal diferencia entre HSMI y HSMI-like, radica en la localización del infiltrado inflamatorio en corazón, ya que en *S. salar* el estrato más afectado es el miocardio compacto ventricular (HSMI), a diferencia de *O. kisutch*, cuyo tejido mayormente afectado corresponde a miocardio esponjoso ventricular (HSMI-like).

- **Relación entre PRV y melanosis**

En un estudio realizado por Bjørgen *et al.*, 2018, se monitoreó el estado del PRV en los peces para investigar con mayor profundidad la asociación entre PRV y los cambios focales de melanosis descritos por Bjørgen *et al.*, 2015. Sus resultados refuerzan la hipótesis de una transición de cambios agudos hemorrágicos a cambios crónicos de melanosis, respaldando la participación de PRV en melanosis focales avanzadas. Los estudios de hibridación *in situ* en PRV mostraron una gran correlación con resultados anteriores (Bjørgen *et al.*, 2015) y argumentan que el PRV persiste y se replica en melanosis focales, lo que posiblemente explique su naturaleza crónica. Es importante destacar que los focos hemorrágicos y de melanosis menos graves pueden ocurrir sin la presencia de PRV.

- **Relación entre PRV y melanosis inducida en forma experimental**

En un estudio no publicado realizado el 2022 por VeHiCe y CEA Vitapro en *O. kisutch* con cuadros de viremia por PRV, se logró evidenciar la presencia de partículas virales en las zonas de lesión focal y de melanosis inducidas experimentalmente. Esto podría sugerir la hipótesis de que el virus migra a través de los macrófagos hacia las zonas de lesión inducida, sin embargo, no se considera al virus como el agente primario en la formación de melanosis.

Hallazgos y Diagnóstico

• Histología

Esta es considerada la técnica "Gold" para el diagnóstico de PRV. Los principales hallazgos en corazón incluyen abundante presencia de células inflamatorias en estrato compacto ventricular y en menor medida en el estrato esponjoso ventricular.

En casos de miocarditis severa, el pronóstico productivo es desfavorable por el extenso compromiso del miocardio ventricular, que podría derivar en insuficiencia cardíaca.

En etapas terminales de insuficiencia cardíaca, se puede encontrar en hígado una necrosis coagulativa con distribución centrolobulillar, lo cual podría indicar un proceso isquémico del tejido.

En músculo rojo, en casos severos, la infiltración celular inflamatoria es extensiva y difusa con una gran cantidad de miocitos necróticos. Sin embargo, no es un hallazgo constante (Kongtorp, 2004), ya que se ha propuesto que se atribuye a variaciones estacionales, en donde es más frecuente en otoño e invierno (Di Cicco *et al.*, 2017).

Adicionalmente, en bazo es posible observar eritrofagia y leucocitosis, lo que indicaría el daño eritrocitario y el proceso infeccioso en curso, respectivamente.

Especie	<i>S. salar</i>	<i>O. kistutch</i>
Epicardio	++	+
Estrato compacto	+++	
Estrato esponjoso	+ ó ++	++
Músculo rojo	++	+ ó ++

Tabla 1: PRV en *S. salar* v/s *O. Kistutch* - cuadros inflamatorios (Fuente: VeHiCe).

• Inmunohistoquímica

Esta técnica permite detectar y visualizar la presencia de antígenos específicos en muestras de tejido mediante el marcaje de anticuerpos, los cuales se unen a los antígenos de PRV presentes en el tejido. La IHQ complementa los análisis histopatológicos, pudiendo detectar y localizar el virus en tejidos con cambios sutiles o en la confirmación en casos dudosos.

También, marcadores inmunohistoquímicos de hemoglobina podrían indicar un daño inicial en la conformación de Hb, lo que permitiría pesquisar con antelación un daño eritrocitario cuando las partículas virales aún no son visibles (Di Cicco *et al.*, 2018).

• Biología Molecular

La técnica PCR se destaca como una de las metodologías más ampliamente empleadas en el diagnóstico del *Piscine Orthoreovirus* (PRV).

A partir de experiencias internas en VeHiCe, se ha observado que es posible lograr un diagnóstico temprano del PRV a través de la detección del virus en muestras sanguíneas, incluso antes de su detección en tejidos u órganos específicos.

En un seguimiento realizado, se logró identificar la presencia del PRV en muestras de sangre de manera **anticipada** que en los tejidos u órganos afectados, aproximadamente 2 a 3 semanas antes de su detección en los órganos afectados.

La detección del PRV en muestras sanguíneas puede servir como un indicador temprano de la infección viral y, por ende, como una herramienta valiosa para el diagnóstico temprano.

• Análisis Sanguíneo

En una infección por PRV, se pueden observar alteraciones en los parámetros bioquímicos que reflejan la respuesta fisiológica y los efectos patológicos en los peces afectados. Estos cambios incluyen el aumento de las enzimas hepáticas ALT y AST, disminución de las proteínas plasmáticas y desequilibrios en los electrolitos. Estos indican lesión hepática, posiblemente asociado a procesos de isquemia, inflamación y alteraciones metabólicas.

En hematología diferencial, en algunos casos, es posible evidenciar alteraciones como un aumento en el número total de leucocitos, una disminución en el porcentaje de linfocitos, un aumento en el número de neutrófilos y una disminución en el número de plaquetas. Estos cambios reflejan una respuesta inflamatoria y una posible supresión de la respuesta inmunológica.

Además, se pueden observar alteraciones eritrocitarias como morfología anormal, formas fragmentadas, así como también, la presencia de viroplasmas (cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos), características de una infección por PRV, aunque no patognomónicas.



Imagen 1: Coágulo en cavidad pericárdica (flecha) en *S. salar* con cuadro de HSMI.

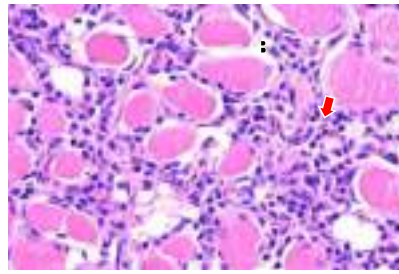


Imagen 6: H&E. Infiltrado inflamatorio en músculo rojo en *O. kisutch* en cuadro por PRV.



Imagen 2: Coágulo en cavidad pericárdica (flecha roja), hígado con colestasis biliar (flecha negra), grasa visceral ictérica (flecha azul) en *O. kisutch* con cuadro de ictericia

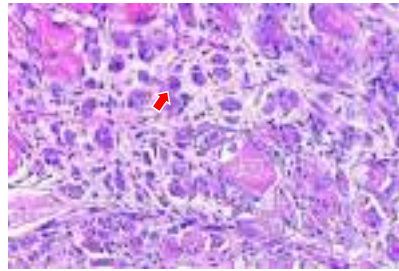


Imagen 7: H&E. Infiltrado inflamatorio en músculo rojo con regeneración de fibras musculares rojas en *S. salar* con un cuadro de PRV.



Imagen 3: Coágulo en cavidad pericárdica (flecha) en *O. kisutch* con cuadro de HSMI-like.

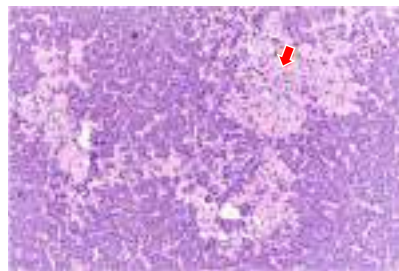


Imagen 8: H&E. Necrosis coagulativa hepática centrolobulillar (flecha) en *S. salar* asociado a una insuficiencia cardíaca terminal.

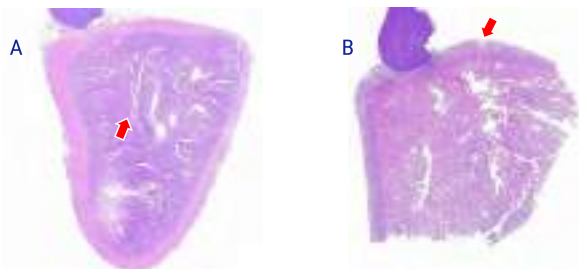


Imagen 4: H&E. Miocarditis en estrato esponjoso (flecha) en *O. kisutch* (A) v/s miocarditis en estrato compacto (flecha) en *S. salar* (B).

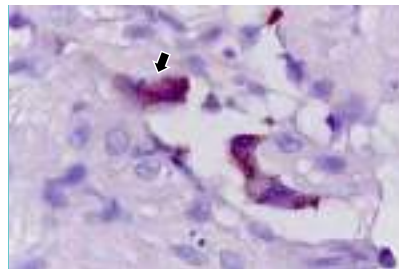


Imagen 9: IHQ-PRV. Reacción positiva a PRV en estrato esponjoso ventricular en macrófagos y células endocárdicas de *S. salar* (flecha).

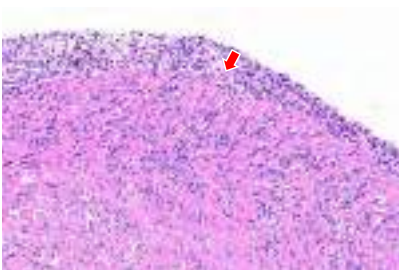


Imagen 5: H&E. Epicarditis severa (flecha) en *S. salar* en cuadro por PRV.



Imagen 10: IHQ-PRV. Reacción positiva a PRV en estrato esponjoso ventricular de *O. kisutch* (flecha).

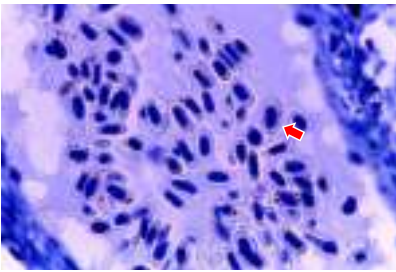


Imagen 11: IHQ-PRV.

Viroplasmos o inclusiones intracitoplasmáticas en eritrocito (flecha) en *O. kisutch*.

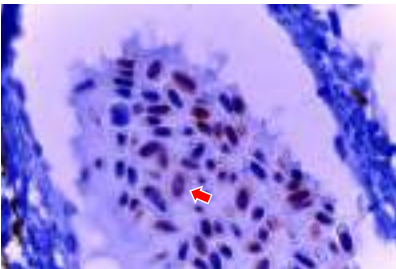


Imagen 12: IHQ Hemoglobina.

Reacción positiva a IHQ-Hb en eritrocitos circulantes (flecha) en *O. kisutch*.

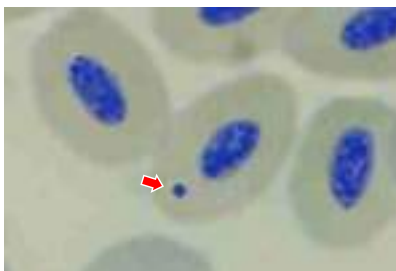


Imagen 13: Frotis sanguíneo.

Viroplasma o inclusión intracitoplasmática en eritrocito (flecha) en *S. salar*.

Referencias

Bjørngen, H., Wessel, Ø., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Sveier, H., Sæbø, H. R., ... Koppang, E. O. (2015). Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Veterinary Research*, 46(1). doi:10.1186/s13567-015-0244-6

Bjørngen, H., Wessel, Ø., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Sveier, H., Sæbø, H. R., ... Koppang, E. O. (2015). Piscine orthoreovirus (PRV) in red and melanised foci in white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Veterinary Research*, 46, 89. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0244-6>

Bustos, P., Rosas, M., Bohle, H., Ildefonso, R., Sandoval, A., Gaete, A., Araya, C., Grothusen, H., Tapia, E., Gallardo, A., Rojas, M., Lara, M., Labra, A., Gálvez, C., 2011. First report of Piscine Reovirus in Atlantic salmon farmed in Chile. Primer reporte de Piscine Reovirus en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), cultivado en Chile (in spanish). *Revista Versión diferente*. 15, 65-68.

Cartagena J., Jiménez C. and Spencer E., Detection of Piscine orthoreoviruses (PRV-1b AND PRV-3a) in farmed Coho salmon with jaundice syndrome from Chile, *Aquaculture* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735480>

Dahle, M. K., Wessel, Ø., Timmerhaus, G., Nyman, I. B., Jørgensen, S. M., Rimstad, E., & Krasnov, A. (2015). Transcriptome analyses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes infected with Piscine orthoreovirus (PRV). *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 780-790. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.049>.

Dhamotharan, K., Vendramin, N., Markussen, T., Wessel, Ø., Cuenca, A., Nyman, I., Olsen, A., Tengs, T., Krudtaa Dahle, M., Rimstad, E., 2018. Molecular and Antigenic Characterization of Piscine orthoreovirus (PRV) from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Viruses*. 10, 170. <https://doi.org/10.3390/v10040170>

Dhamotharan K, Tengs T, Wessel Ø, Braaen S, Nyman IB, Hansen EF, et al. Evolution of the Piscine Orthoreovirus Genome Linked to Emergence of Heart and Skeletal Muscle Inflammation in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Viruses* (2019) 11(5):465. doi: 10.3390/v11050465

Di Cicco E, Ferguson HW, Schulze AD, Kaukinen KH, Li S, Vanderstichel R, et al. Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) Disease Diagnosed on a British Columbia Salmon Farm Through a Longitudinal Farm Study. *PLoS One* (2017) 12(2):e0171471. doi: 10.1371/journal.pone.0171471

Di Cicco, E., Ferguson, H.W., Kaukinen, K.H., Schulze, A.D., Li, S., Tabata, A., Günther, O.P., Mordecai, G., Suttle, C.A., Miller, K.M., 2018. The same strain of Piscine orthoreovirus (PRV-1) is involved in the development of different, but related, diseases in Atlantic and Pacific Salmon in British Columbia. *FACETS*. 3, 599-641. <https://doi.org/10.1139/facets-2018-0008>

Finstad, Ø., Dahle, M., Lindholm, T., Nyman, I., Løvoll, M., Wallace, C., Rimstad, E. (2014). Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Veterinary Research*, 45(35), 1297-9716. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-35>.

Godoy, M.G., Kibenge, M.J.T., Wang, Y., Suarez, R., Leiva, C., Vallejos, F., Kibenge, F.S.B., 2016. First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV. *Virology* 13, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0554-y>

Godoy M, Medina DA, Suarez R, Valenzuela S, Romero J, Kibenge M, et al. Extensive Phylogenetic Analysis of Piscine Orthoreovirus Genomic Sequences Shows the Robustness of Subgenotype Classification. *Pathogens* (2021) 10:1-12. doi: 10.3390/pathogens10010041

Haatveit, H., Wessel, Ø., Markussen, T., Lund, M., Thiede, B., Nyman, I., Rimstad, E. (2017). Viral protein kinetics of piscine orthoreovirus infection in Atlantic salmon blood cells. *Viruses*, 9(3), 49. <https://doi.org/10.3390/v9030049>.

Hauge H, Dahle M, Moldal T, Thoen E, Gjevre A-G, Weli S, Alarcón M, Grove S: Piscine orthoreovirus can infect and shed through the intestine in experimentally challenged Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vet Res* 2016, 47(1):57.

Hauge H, Vendramin N, Taksdal T, Olsen AB, Wessel Ø, Mikkelsen SS, et al. Infection Experiments With Novel Piscine Orthoreovirus From Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) in Salmonids. *PLoS One* (2017) 12:1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0180293

Kongtorp RT, Kjerstad A, Taksdal T, Guttvik A, Falk K. Heart and Skeletal Muscle Inflammation in Atlantic Salmon, *Salmo Salar* L.: A New Infectious Disease. *J Fish Dis* (2004) 27:351-8. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00549.x

Kongtorp RT, Taksdal T, Lyngøy A. Pathology of Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI) in Farmed Atlantic Salmon *Salmo Salar*. *Dis Aquat Organisms* (2004) 59:217-24. doi: 10.3354/dao059217

Lai, C. M., Mainou, B. A., Kim, K. S., & Dermody, T. S. (2013). Directional release of reovirus from the apical surface of polarized endothelial cells. *MBio*, 4(2), e00049-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00049-13>.

Løvoll, M., Alarcón, M., Bang Jensen, B., Taksdal, T., Kristoffersen, A. B., & Tengs, T. (2012). Quantification of piscine reovirus (PRV) at different stages of Atlantic salmon *Salmo salar* production. *Diseases of aquatic organisms*, 99(1), 7-12. <https://doi.org/10.3354/dao02451>

Lund M, Røsæg MV, Krasnov A, Timmerhaus G, Nyman IB, Aspehaug V, et al. Experimental Piscine Orthoreovirus Infection Mediates Protection Against Pancreas Disease in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Vet Res* (2016) 47:1-16. doi: 10.1186/s13567-016-0389-y

Malik MS, Bjørgen H, Dhamotharan K, Wessel Ø, Koppang EO, di Cicco E, et al. Erythroid Progenitor Cells in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) may be Persistently and Productively Infected With Piscine Orthoreovirus (PRV). *Viruses* (2019) 11:824. doi: 10.3390/v11090824

Mohamed A, Johnston RN, Shmulevitz M: Potential for Improving Potency and Specificity of Reovirus Oncolysis with Next-Generation Reovirus Variants. *Viruses* 2015, 7(12):6251-6278.

Morton, A., Routledge, R., Hrushowy, S., Kibenge, M., Kibenge, F., 2017. The effect of exposure to farmed salmon on piscine orthoreovirus infection and fitness in wild Pacific salmon in British Columbia, Canada. *PLoS One*. 12, e0188793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188793>

Netherton C, Moffat K, Brooks E, Wileman T: A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Virus Res* 2007, 70:101-182.

Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C: Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* 2005, 97(2):147-172.

Polinski MP, Vendramin N, Cuenca A, Garver KA. Piscine Orthoreovirus: Biology and Distribution in Farmed and Wild Fish. *J Fish Dis* (2020) 43:1331-52. doi: 10.1111/jfd.13228

Polinski MP, Marty GD, Snyman HN, Garver KA. Piscine Orthoreovirus Demonstrates High Infectivity But Low Virulence in Atlantic Salmon of Pacific Canada. *Sci Rep* (2019) 9:1-22. doi: 10.1038/s41598-019-40025-7

Secombes CJ, Ellis AE: The immunology of teleosts. In: Fish pathology. Edited by Roberts RJ. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2012.

Smith, P.A., Larenas, J., Contreras, J., Cassigoli, J., Venegas, C., Rojas, M.E., Guajardo, A., Perez, S., Diaz, S., 2006. Infectious haemolytic anaemia causes jaundice outbreaks in seawater - cultured coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in Chile. *J Fish Dis*. 29, 709-715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00766.x>

Vallejos-Vidal E., Reyes-López F., Sandino A., Imarai M. Sleeping with the Enemy? The Current Knowledge of Piscine Orthoreovirus (PRV) Immune Response Elicited to Counteract Infection. *Frontiers in Immunology* (2022) Vol 14. doi.org/10.3389/fimmu.2022.768621

Vendramin N, Kannimuthu D, Olsen AB, Cuenca A, Teige LH, Wessel Ø, et al. Piscine Orthoreovirus Subtype 3 (PRV-3) Causes Heart Inflammation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Vet Res* (2019) 50:1-13. doi: 10.1186/s13567-019-0632-4

Wessel Ø, Braaen S, Alarcon M, Haatveit H, Roos N, Markussen T, et al. Infection With Purified Piscine Orthoreovirus Demonstrates a Causal Relationship With Heart and Skeletal Muscle Inflammation in Atlantic Salmon. *PLoS One* (2017) 12:1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0183781

Wessel Ø, Hansen EF, Dahle MK, Alarcon M, Vatne NA, Nyman IB, et al. Piscine Orthoreovirus-1 Isolates Differ in Their Ability to Induce Heart and Skeletal Muscle Inflammation in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Pathogens* (2020) 9:1-22. doi: 10.3390/pathogens9121050

FABRICA DE PANELES FRIGORIFICOS / SOLUCIONES CONSTRUCTIVAS TERMOAISLANTES



PRODUCTOS

FrigoPol

PANEL POLIESTIRENO EXPANDIDO (EPS)

FrigoPur - Pir - Lock

PANEL POLIURETANO O POLIISOCIANURATO INYECTADO CONTINUO

TechoPol

PANEL CUBIERTA POLIESTIRENO EXPANDIDO (EPS)

TermoRoof Pur - Pir

TERMOROOF POL D2-4

Puertas Frigorificos

PUERTAS FRIGORIFICOS

+56 9 6236 9684

termoindustrial

+56 2 6469 1890

www.termoindustrial.cl

BENEFICIOS DE LA HARINA DE KRILL EN LA PRODUCCIÓN DE SALMÓNIDOS



Kiranpreet Kaur¹, Sandra Bravo²

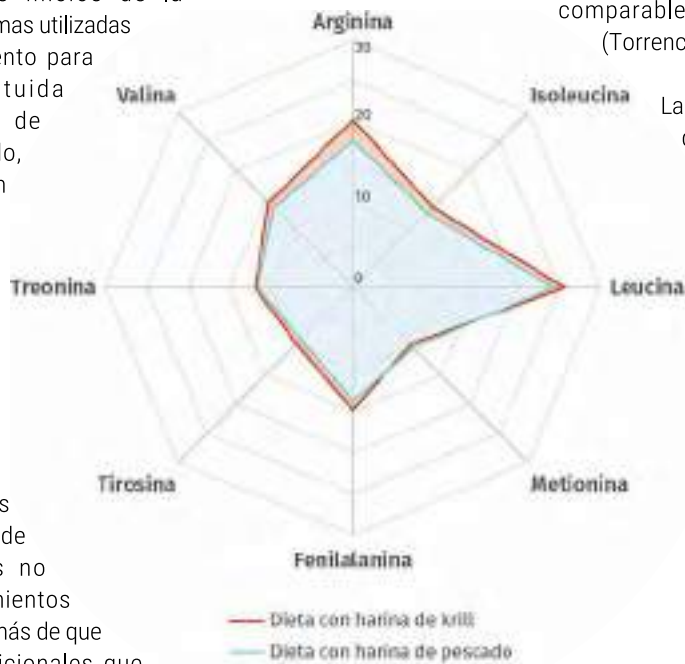
¹ AkerBiomarine

² Universidad Austral de Chile

Durante las últimas décadas, los salmónidos han sido el producto más importante de la acuicultura en términos de valor, siendo el salmón del Atlántico la especie que lidera la producción a nivel mundial. Los volúmenes de producción de salmón de cultivo han incrementado en los últimos años, sin embargo, con la creciente sostenida demanda, también se ha registrado un incremento en la demanda por alimentos para consumo humano que sean más sustentables. En los inicios de la salmonicultura, las materias primas utilizadas para la producción del alimento para salmones estuvo constituida principalmente por harina de pescado y aceite de pescado, pero la inconsistencia en el suministro de estos ingredientes marinos, las fluctuaciones en el precio y la creciente crítica acerca del uso de peces marinos para alimentar salmones de cultivo, ha llevado a los productores a buscar ingredientes alternativos más sustentables. Entre las materias primas alternativas se destacan las de origen vegetal, pero éstas no logran alcanzar los requerimientos nutricionales de los peces, además de que contienen factores anti-nutricionales que afectan la palatabilidad de los alimentos de peces y desencadenan respuestas inmunes indeseadas (Glencros et al., 2020). Una de las materias primas con mayores atributos nutricionales es la harina de krill, la que tiene un perfil nutricional y sabor que promueve la ingesta de alimento, mejora la tasa de conversión e incrementa la calidad del filete (Mørkøre et al., 2020; Roncarati et al., 2011). La harina de krill además de generar un alta tasa de crecimiento, fortalece el sistema inmune de los peces, y por ende, tiene un rol esencial en la disminución de enfermedades y de la mortalidad.

Perfil nutricional de la harina de krill:

El perfil nutricional de la harina de krill (Figura 1) incluye fosfolípidos, altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (EPA y DHA); astaxantina; aminoácidos libres; nucleótidos y N-óxido de trimetilamina (TMAO) que incentivan la alta palatabilidad del krill, además de un perfil de aminoácidos comparables al de la harina de pescado (Torrencillas et al., 2021)



La harina de krill es preparada a partir del krill antártico, que tiene un perfil nutricional balanceado, compuesto por alrededor de 57% de proteínas y 25% de lípidos. El aceite de krill es extraído a partir de la harina de krill que concentra su fracción de lípidos (Figura 2).

Figura 1: Gráfico comparativo del perfil de aminoácidos esenciales (en g 100g⁻¹ de dieta) en dietas con harina de krill y con harina de pescado (Fuente: Moreno-Arias, A. et al., 2017)



Figura 2: Perfil nutricional del krill (Fuente: Kaur et al., 2022)

Beneficios Nutricionales de la Harina de Krill

En la figura 3 se muestran los beneficios de la harina de krill en la salud de los salmónidos, por lo que es considerada un superalimento en la dieta para peces.

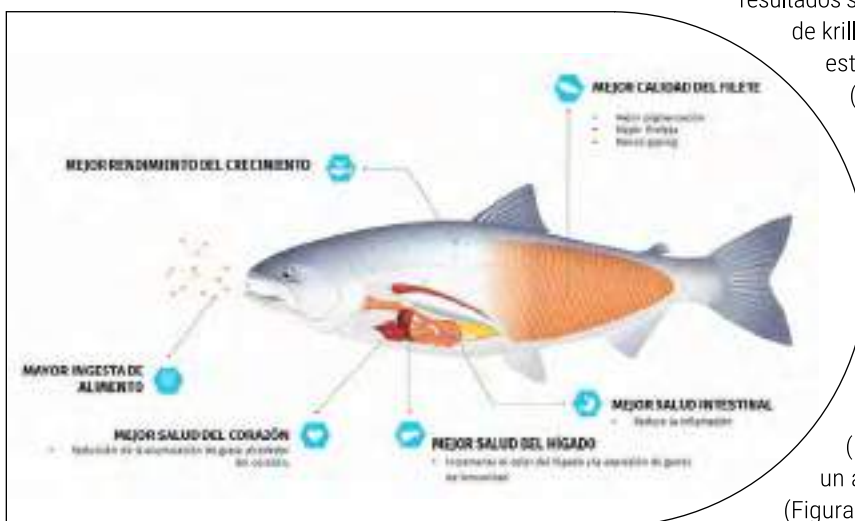


Figura 3: Beneficios de la harina de krill en la producción de salmones (Fuente: Kaur et al., 2022)

Mayor ingesta alimenticia y mayor rendimiento en el crecimiento:

En los primeros estudios llevados a cabo a finales de los 70s en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se reemplazó parcialmente la harina de pescado por harina de krill, lo que causó una mayor ingesta de alimento y un incremento en el peso corporal. Similares resultados se obtuvieron en la dieta suplementada con harina de krill en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). En otros estudios realizados a comienzos de los años 2000 (Olsen et al., 2006; Julshamn et al., 2004), usando distintas dosis de harina de krill como reemplazo parcial de la harina de pescado (20-40%), dieron como resultado incrementos del peso de los peces y de la tasa de crecimiento específico (TCE).

Hatlen et al. (2017) reportaron que smolts de salmón del Atlántico alimentados con dietas de harina de pescado (HP) suplementadas con 7,5 y 15% de harina de krill (HK), después de su traspaso al mar, tuvieron un aumento significativo en la ingesta de alimento (Figura 4), en la ganancia en peso y en el TCE (Figuras 5 y 6). En un segundo ensayo, se incorporó 10% de harina de krill (100 g/kg) para reemplazar parcialmente la dieta de harina de pescado previo a la cosecha, observándose una ganancia de

peso significativamente mayor con la dieta de harina de krill comparada con la dieta con sólo harina de pescado (23,0% en el grupo con harina de krill versus 20,4% en el grupo con harina de pescado)

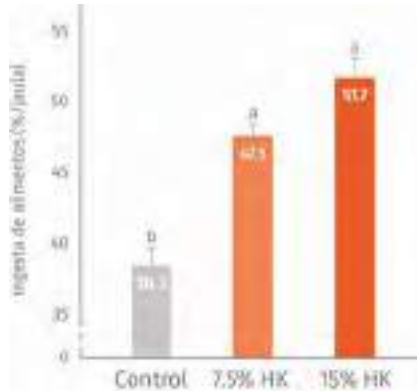


Figura 4: Ingesta de alimentos del salmón del Atlántico con reemplazo de 7,5% y 15% de harina de krill (HK). Los superíndices indican diferencias ($p < 0,05$) entre dietas. (Fuente: Hatlen et al. (2017))

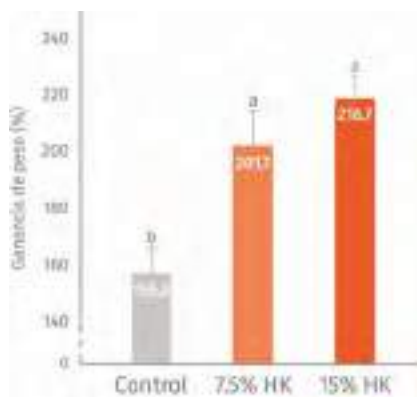


Figura 5: Ganancia en peso del salmón del Atlántico con reemplazo de 7,5% y 15% de harina de krill (HK). Los superíndices indican diferencias ($p < 0,05$) entre dietas (Fuente: Hatlen et al. (2017))

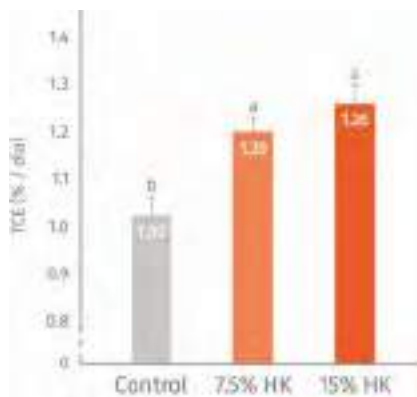


Figura 6: Tasa de crecimiento específico (TCE) del salmón del Atlántico con reemplazo de 7,5% y 15% de harina de krill (HK). Los superíndices indican diferencias ($p < 0,05$) entre dietas. (Fuente: Hatlen et al. (2017))

El krill es también un potenciador del crecimiento en la etapa pre-smolt en agua dulce. En un ensayo realizado por Kvingedal et al. (2023), en pre-smolts de salmón del Atlántico, se demostró que la fosfatidilcolina de la harina de krill y el aceite de krill es una fuente natural de colina, de mejor calidad que el cloruro de colina inorgánico, reportando que con la adición de 8 y 12% de harina de krill se lograron mayores rendimientos de crecimiento con los fosfolípidos aportados por la harina de krill en comparación con los fosfolípidos originados de otras fuentes como la lecitina de soja y los fosfolípidos de la harina de pescado (Kvingedal et al. 2023).

Calidad del filete y pigmentación de la carne:

Usualmente, la satisfacción del consumidor no sólo está determinada por el sabor, sino que también por la firmeza y la textura del filete. Cuando la calidad de los filetes se ve afectada, ya sea por la pérdida de la integridad del filete (gaping), o por la presencia de melanina, éstos suelen ser rechazados por los consumidores, estimándose una pérdida por gaping de hasta 38% del valor de los salmones de cultivos (Pittman et al., 2013).

En un estudio realizado por Mørkøre et al. (2020) en salmón del Atlántico, se reportó que con la incorporación de 12% de harina de krill se alcanza mayor firmeza e integridad del filete, además de una reducción del gaping (Figura 7).

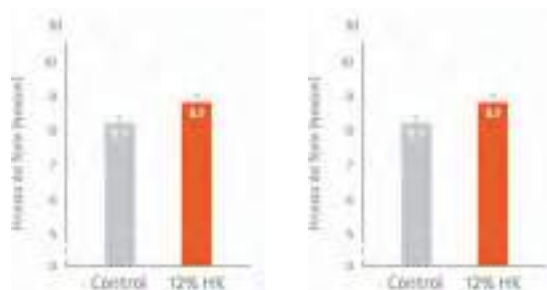


Figura 7: Grado de gaping en el filete (a) y firmeza del filete (b) en salmón del Atlántico alimentado con una dieta con 12% de harina de pescado (control), comparada con una dieta con reemplazo de 12% de harina de krill (HK), suministrada por un período de 90 días previo a la cosecha (Fuente: Mørkøre et al., 2020)

Adicionalmente, se ha demostrado que la dieta suplementada con harina de krill tiene un efecto positivo al preservar la estructura original de las fibras de colágeno, lo que se ha asociado a la mantención de la firmeza e integridad del filete. En un estudio realizado con salmón del Atlántico alimentado con harina de krill se observó que el filete mostraba una arquitectura del colágeno bien organizada y más compacta comparada con aquella de peces alimentados con una dieta control con harina de pescado (Mørkøre et al., 2020).

El color rosado es el indicador principal de la calidad del filete y ha llevado a que los productores consideren la suplementación, principalmente con astaxantina, para asegurar la coloración roja de la carne. El color rosado a rojo profundo del filete del salmón del Atlántico se origina a partir de carotenoides, un pigmento que los salmónidos no pueden sintetizar, sino que deben ingerirlo. Sin embargo, el límite máximo de astaxantina sintética permitido en las dietas de salmónidos es de 100 mg/kg, tal como lo indica la EFSA. La harina de krill contiene astaxantina en forma natural y actúa positivamente en la pigmentación, logrando un color de filete significativamente más rojo que el del grupo con harina de pescado de acuerdo a estudios realizados con salmón del Atlántico (Figura 8).

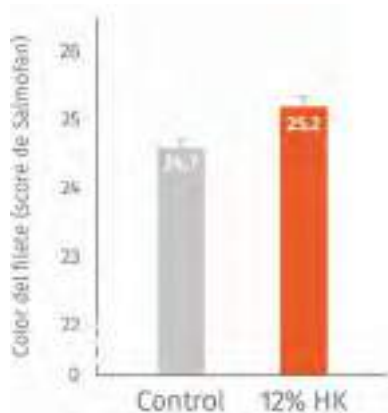


Figura 8: Intensidad del color del filete (medido con la regla de SalmoFan™) en salmón del Atlántico alimentado con una dieta con 12% de harina de pescado (control), comparada con una dieta con reemplazo de 12% de harina de krill (HK), suministrada por un período de 90 días previo a la cosecha (Fuente: Mørkøre et al., 2020)

Salud del hígado, intestinos y corazón

La composición lipídica de la dieta de peces afecta la clase de lípidos y la composición de los ácidos grasos en los salmónidos. La harina de krill mejora el perfil de los ácidos grasos en los peces, registrándose más ácidos grasos omega 3 y menos ácidos grasos omega 6. A diferencia de la harina de pescado, en que los ácidos grasos omega 3 están ligados a triglicéridos, en la harina de krill éstos están ligados a fosfolípidos y, por lo tanto, son incorporados a los tejidos más eficientemente.

Algunos estudios han descrito que las dietas deficientes en fosfolípidos o dietas a base de vegetales causan problemas intestinales. Por ejemplo, se ha observado que dietas formuladas con proteína de poroto o poroto de soya inducen inflamación intestinal aguda (Bjørngen et al., 2018), afectando también al hígado, con consecuencias que incluyen esteatosis y mayor deposición de lípidos en los hepatocitos.

Mørkøre et al. (2020) reportaron que la incorporación de 12% de harina de krill en la dieta de peces aumenta la salud intestinal mediante la reducción de los niveles de lípidos, además de generar una reducción de la palidez del hígado en salmón del Atlántico, patología que está asociado comúnmente con desórdenes nutricionales. Adicionalmente, los mismos autores observaron una reducción de corazones grasos en salmón del Atlántico alimentados con harina de krill, lo que indica que ésta puede modificar el transporte de lípidos y su deposición en distintos órganos. Esto sugiere que la fracción de fosfolípidos de la harina de krill sería la responsable de estas modificaciones. Por otra parte, un análisis de microarray de tejidos de hígado reveló una mayor expresión de caderina-13 en el hígado de peces alimentados con harina de krill. La caderina-13 está asociada con los niveles circulantes de la proteína adiponectina secretada por adipocitos, la cual tiene un potencial antiinflamatorio y juega un rol importante en la regulación metabólica, y se relaciona con el índice de hígado graso en humanos.

En estudios realizados en agua dulce con dietas suplementadas con 12% de harina de krill, indicaron un aporte de 2,6 g de colina /kg en la dieta, reduciendo significativamente la acumulación de grasa en los ciegos pilóricos y en el hígado, en la misma medida que una dieta con altos niveles de suplementación con cloruro de colina (4 g / Kg), lo que demuestra que la fosfatidilcolina de la harina de krill es igualmente efectiva que altos niveles de cloruro de colina inorgánico adicionados a las dietas (Kaur et al., 2023).

Las dietas con adición de harina de krill también afectan la comunidad microbiana del intestino. Bozzi et al. (2021) mostraron el rol crítico que tiene la microbiota comensal en el intestino para asegurar su salud y función adecuada en procesos tales como protección a patógenos, respuestas inmunes, nutrición y metabolismo. Ringø et al. (2006) demostraron que la quitina, componente esencial del exoesqueleto del krill, parece actuar como prebiótico al seleccionar bacterias autóctonas que tienen el potencial de prevenir el crecimiento y colonización de bacterias patógenas en el tracto digestivo. Los mismos autores demostraron que el perfil de la microbiota fue modulado por la incorporación de harina de krill, permitiendo la exclusión de varias bacterias dañinas tales como *Carnobacteria piscicola*, *Staphylococcus equorum* spp. *linens*, *Psychrobacter* spp. y *Psychrobacter glacincola*.

Conclusiones

Algunos resultados a partir de experimentos realizados con trucha arcoíris y salmón del Atlántico han mostrado, consistentemente, que pequeñas cantidades de harina de krill pueden ser agregadas a dietas bajas en harina de pescado con resultados notables. Además de presentar importantes beneficios en la calidad del filete y la robustez de los peces, la incorporación de pequeñas cantidades de harina de krill en la dieta tiene efectos positivos en la ingesta de alimento, en el crecimiento, y en la salud hepática e intestinal.

Referencias Bibliográficas

- Bozzi, D. et al.** Salmon gut microbiota correlates with disease infection status: potential for monitoring health in farmed animals. *Animal Microbiome* **3**, 30 (2021).
- BjØrgen, H. et al.** Ectopic epithelial cell clusters in salmonid intestine are associated with inflammation. *J. Fish Dis.* **41**, (2018).
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).** Scientific Opinion on the safety and efficacy of synthetic astaxanthin as feed additive for salmon and trout, other fish, ornamental fish, crustaceans and ornamental birds. *EFSA Journal* **12**, 3724 (2014).
- Glencross, B. D. et al.** Risk assessment of the use of alternative animal and plant raw material resources in aquaculture feeds. *Reviews in Aquaculture* **12**, 703-758 (2020).
- Hatlen, B. et al.** The effect of low inclusion levels of Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal on growth performance, apparent digestibility and slaughter quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Nutr.* **23**, 721-729 (2017).
- Julshamn, K., Malde, M. K., Bjorvatn, K. & Krogedal, P.** Fluoride retention of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed krill meal. *Aquacult. Nutr.* **10**, 9-13 (2004).
- Kaur, K., Å. Krogdahl, and T.M. Kortner,** *Phosphatidylcholine in Krill Meal and Krill Oil as a Source of Choline for Prevention of Intestinal Steatosis in Atlantic Salmon.* Aquaculture Research, 2023. **2023**.
- Kvingedal, R., et al.,** *Effects of Different Phospholipid Sources on Growth and Gill Health in Atlantic Salmon in Freshwater Pre-Transfer Phase.* Animals, 2023. **13**(5): p. 835.
- Mørkøre, T. et al.** Dietary inclusion of Antarctic krill meal during the finishing feed period improves health and fillet quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Br. J. Nutr.* **124**, 418-431 (2020).
- Moreno-Arias, A. et al.** Effect of fishmeal replacement with a vegetable protein mixture on the amino acid and fatty acid profiles of diets, biofloc and shrimp cultured in BFT system. *Aquaculture* **2018**, 56-62 (2017).
- Olsen, R. E. et al.** The replacement of fish meal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquacult. Nutr.* **12**, 280-290 (2006).
- Pittman, K.** Bridging the Gap to Sustainable Salmon Farming: Overcoming the Gaping Problem. *Journal of Fisheries & Livestock Production* **01**, (2013).
- Roncarati, A. et al.** Effects of dietary supplementation with krill meal on pigmentation and quality of flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ital. J. Anim. Sci.* **10**, e27 (2011).
- Torrecillas, S., Montero, D., Carvalho, M., Benitez-Santana, T. & Izquierdo, M.** Replacement of fish meal by Antarctic krill meal in diets for European sea bass *Dicentrarchus labrax*: Growth performance, feed utilization and liver lipid metabolism. *Aquaculture* **545**, 737166 (2021).
- Ringø, E. et al.** The effect of dietary krill supplementation on epithelium-associated bacteria in the hindgut of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a microbial and electron microscopical study. *Aquac. Res.* **37**, 1644-1653 (2006).



Figura 9: a) Krill antártico (*Euphausia superba*); b) Harina de krill

EN MATERIA ENERGÉTICA OFRECEMOS UN MAR DE SOLUCIONES

Existimos para potenciar el desarrollo y movimiento de las personas, las empresas y el país, por eso acompañamos a la industria acuícola en sus desafíos con una completa gama de soluciones.



Entrega de combustible
via barcos



Lubricantes



Eficiencia
energética



Paneles solares
y más



Mobil

COPEC

Hierro y vesículas de membrana de *Renibacterium salmoninarum*: Estudio de su rol en la patogenicidad de salmón del Atlántico.



Macarena Echeverría-Bugueño^{1,2}, Rubén Avendaño-Herrera^{1,2,3}

¹ Laboratorio de Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile

² Centro FONDAP, Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Universidad Andrés Bello, Viña del Mar, Chile

³ Centro de Investigación Marina Quintay (CIMARQ), Universidad Andrés Bello, Valparaíso, Chile

La enfermedad bacteriana del riñón o *Bacterial Kidney Diseases* (BKD) es la primera infección bacteriana descrita en peces cultivados en Chile (Sanders & Barros, 1986). Aunque durante más de dos décadas se mantuvo bajo control, comenzando a recrudecer después de la crisis del virus de la anemia infecciosa del salmón en 2007, pues a partir del 2010 la salmicultura comenzó a moverse hacia el sur de la Región de Los Lagos y se intensificó en la Región de Magallanes y la Antártica Chilena (Ibieta et al., 2011). En esta zona la temperatura del agua de mar es muy fría, fluctuando entre 6 a 10°C, lo que es óptimo para la multiplicación del agente causal del BKD y se evidencian los cuadros mas severos de BKD. En 2021, esta patología causó el 12,1%, 9,3% y 3,8% de las mortalidades en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*), respectivamente (SERNAPESCA, 2021). Además, recientes datos provenientes de Aquabech muestran un incremento de las mortalidades por *R. salmoninarum* en 2022.

Renibacterium salmoninarum es una bacteria Gram positivo, tiene forma de diplobacilo, con características de patógeno intracelular y de tamaño pequeño (0,3 a 1 y de 1 a 1,5 µm), su crecimiento es lento y fastidioso en medios de cultivo (Bethke et al., 2019). Así, en el medio KDM-2 (o sus variaciones) puede tardar de 4 a 12 semanas en crecer (Evelyn et al., 1989; Gudmundsdóttir et al., 1991). Esta dificultad en su crecimiento complica su estudio *in vitro*, por lo que los mecanismos involucrados en su virulencia aún presentan muchas preguntas.

El patógeno tiene una amplia distribución, infectando salmónidos cultivados y silvestres de todo el mundo durante todo su ciclo de vida y, en agua dulce y salada (Delghandi et al., 2020). Además, la bacteria se transmite a través del agua y especialmente a través de los huevos hacia las progenies, dificultando así su control y

permanencia en los centros de cultivos (Evelyn et al., 1986). De hecho, en Chile, el Programa Sanitario General de la Reproducción de Peces (PSGR) no ha sido capaz de controlar la transferencia de *R. salmoninarum* desde reproductores a su progenie (SERNAPESCA, 2020). El problema del diagnóstico del BKD cuando se compara con otras infecciones bacterianas es una presentación crónica en los peces y sin síntomas externos macroscópico visible durante el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, los peces cultivados en las pisciculturas son portadores asintomáticos de la bacteria, siendo transportados con *R. salmoninarum* a engorda en mar.

Para que una enfermedad bacteriana se desarrolle deben ocurrir diversos procesos biológicos en el pez. En un comienzo, la bacteria debe encontrar al pez y adherirse, siendo diversos los mecanismos de interacción como formación de biofilm, propiedades de hidrofobicidad, flagelos, entre otras. Posteriormente, se genera la colonización y debe multiplicarse, para ello el microorganismo patógeno despliega

todo el repertorio de los factores envueltos en la virulencia (Hamed et al., 2018). Hasta ahora, el conocimiento de los factores de virulencia que participarían en la patogenia de *R. salmoninarum* se han estudiado de forma individual, siendo imprescindible una correlación y asociación entre ellos, ya que usualmente estos

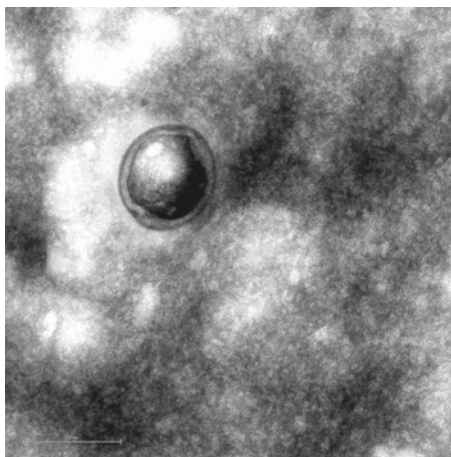


Figura 1: Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión representativa de las vesículas de membrana de los aislados de *R. salmoninarum*. Las vesículas extracelulares de *R. salmoninarum* se observan como esferas que se desprenden desde la bacteria, y que rondan el tamaño previamente descrito para las vesículas (>200 nm). Además, tienen tamaños heterogéneos y su producción varía dependiendo de las condiciones de crecimiento y del aislado del que provienen.

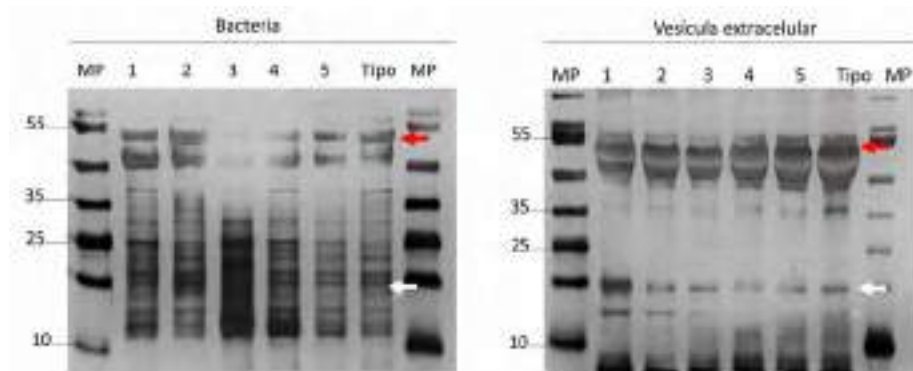


Figura 2: Electroforesis de proteínas SDS-PAGE de aislados de *Renibacterium salmoninarum* y sus vesículas extracelulares. Los aislados 1 a 5 corresponden a representantes de los distintos linajes genéticos, mientras que la cepa tipo corresponde a DSM 20767. Se indica con flecha roja la proteína p57 y con flecha blanca la proteína p22.

mecanismos funcionan como un todo y no aisladamente. El factor de virulencia mejor caracterizado en *R. salmoninarum* es una proteína de 57 kDa (llamada p57) presente en la superficie de la célula bacteriana (70% del total) y secretada al medio y al entorno del huésped como proteína completa y/o péptidos (Wiens, 2008). Esta proteína está codificada por dos copias de los genes *msa1* y *msa2* del antígeno soluble principal (*msa*), que son esenciales para la virulencia total de *R. salmoninarum* (Coady et al., 2006). Además, se ha descrito la identificación de un tercer gen *msa3* en algunos aislados que serían aún más virulentos (Rhodes et al., 2004). Las propiedades patogénicas de p57 en *R. salmoninarum* incluyen la aglutinación de eritrocitos y leucocitos, adhesión a células del sistema inmune como macrófagos y leucocitos, entre otros.

Otra proteína llamada comúnmente p22, debido a su tamaño de 22 kDa, también ha sido asociada a la virulencia de *R. salmoninarum*; la cual es secretada en el proceso de infección y su rol es aglutinar leucocitos de salmón. Además, al igual que p57, posee características inmunosupresoras, anulando la producción de anticuerpos específicos en células de salmón (Fredriksen et al., 1997). Sin embargo, el conocimiento del rol de p22 es muy limitado, siendo imprescindible profundizar en su estudio y dilucidar su participación en el proceso infeccioso. Bethke et al., (2017) al caracterizar a nivel proteico el crecimiento de aislados chilenos de *R. salmoninarum* demostraron que la expresión de p22 en geles SDS-PAGE es mayor cuando la bacteria se crece en medios microbiológicos con limitación de hierro, lo que precisamente es la condición que ocurre dentro del pez (Hood & Skaar, 2012). Este descubrimiento nos permitió sugerir que, en condiciones limitantes de hierro, *R. salmoninarum* aumenta la producción de p22, lo que podría tener un rol en la patogenicidad.

Es conocido que la exacerbación de estos factores de virulencia depende de los componentes del medio en que se desarrollen las bacterias (Hood & Skaar, 2012). Por ejemplo, la multiplicación bacteriana requiere que el microorganismo posea la capacidad de absorber hierro, un metal que no está disponible libremente en los huéspedes durante una infección (Eichenbaum et al., 1996) y, por lo tanto, es un factor esencial en la patogenicidad de numerosas bacterias, especialmente Gram negativas y menos

estudiado en Gram positivas (Brown & Holden, 2002). Para hacer frente a este problema, algunas bacterias poseen sistemas de captación de hierro, siendo los más comunes aquellas que producen y secretan pequeñas moléculas quelantes de hierro llamadas sideróforos (Lemos & Balado, 2020). En *R. salmoninarum*, inicialmente no se detectó la presencia de sideróforos, siendo los aislados agrupados en hidrofóbicos y no hidrofóbicos (Grayson et al., 1995). De los dos grupos, solamente los aislados hidrofóbicos fueron capaces de crecer en condiciones limitantes de hierro, siendo reconocidos como *R. salmoninarum* virulentos (Grayson et al., 1995)

Nuestro equipo de investigación ha demostrado que *R. salmoninarum* posee mecanismos de virulencia asociados a la captación del hierro, así como que la bacteria usa esta propiedad como una estrategia infecciosa (Bethke et al., 2016; 2017; 2019; Avendaño-Herrera et al., 2022). Por tanto, *R. salmoninarum* produce sideróforos, que son péptidos que se unen al hierro y lo solubilizan facilitando así su transporte, y también posee mecanismos de captación de tipo hemo, los que se unen directamente a los receptores hemo permitiendo así la captación del metal (Brown & Holden, 2002). Además, *R. salmoninarum* tiene la capacidad de vivir en concentraciones de hierro entre 250-300 μM , las cuales comúnmente son tóxicas para otras bacterias (Bethke et al., 2016). En resumen, la presencia de más de un tipo de mecanismo de captación de hierro en el patógeno *R. salmoninarum* y su resiliencia a este metal. De hecho, al analizar el genoma de *R. salmoninarum* se han encontrado proteínas asociadas a regulación de estrés oxidativo, adquisición de hierro, síntesis de cápsula y una gran diversidad de serina proteasas y hemolisinas, las que están asociadas directamente con los signos clínicos de la patología (Wiens et al., 2008). Entre los genes clásicos asociados a captación de hierro se encuentran aquellos de la familia Ider/DtxR (Bethke et al., 2018). Mas recientemente, el uso de la proteómica celular nos ha permitido identificar diferencias a nivel de expresión de proteínas de *R. salmoninarum* que la p57 aumenta su abundancia al doble en la cepa virulenta H-2 cuando se creció en condiciones limitantes de hierro, lo que no ocurre con la cepa de *R. salmoninarum* ATCC 33209 (Avendaño-Herrera et al., 2022). También en el mismo estudio se determinó un incremento en la expresión de p22.

Otro factor de virulencia que ha alcanzado notoriedad en estos últimos años corresponde a las vesículas de membrana externa, las que se liberan de manera constitutiva y hasta hace no muchos años atrás se creía que eran exclusivas de las bacterias Gram negativas. Recientemente, el análisis de la cepa virulenta H-2 permitió demostrar que *R. salmoninarum* produce vesículas de membrana, mostrando en condiciones *in vitro* que estas vesículas poseen actividad citotóxica y citopática en células de salmón SHK-1, sugiriendo que estas partículas parecen jugar un rol en la invasión celular a las 48 h de exposición (Echeverría-Bugueño et al., 2021). De hecho, las vesículas de membrana resultaron ser más tóxica que la misma cepa virulenta H-2, aun cuando la composición proteica de las vesículas fue similar a los componentes de la membrana de la bacteria H-2 y evidenciándose p22 y p57.

Es interesante señalar que también en 2021, colegas alemanes estudiando la cepa de referencia ATCC 33209 han confirmado nuestros resultados, reportando la producción de vesículas en *R. salmoninarum* (Kroniger et al., 2022). De hecho, Kroniger et al., (2022) analizaron el proteoma de *R. salmoninarum* ATCC 33209, identificando 176 proteínas en las vesículas, encontrando en su interior como mayoritarias a p57 y p22 (Kroniger et al., 2022), apoyando nuestra hipótesis sobre la función de transporte de las vesículas de factores de virulencia hacia el huésped (Echeverría-Bugueño et al., 2021). Como se evidencia, el novedoso descubrimiento de las vesículas de membrana en dos cepas de *R. salmoninarum* (H-2 y ATCC 33209) abre numerosas preguntas, incluyendo si las vesículas son liberadas por otros aislados de *R. salmoninarum*, lo que exige el estudio de nuevas bacterias pertenecientes a los diversos grupos genéticos descritos en la literatura.

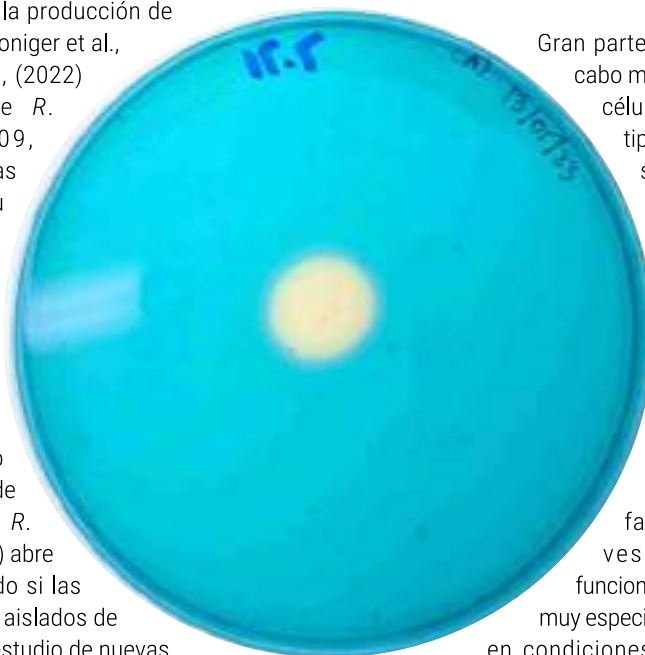
El primer acercamiento para dilucidar los mecanismos de patogenicidad es una aproximación *in vitro* usando cultivos celulares o primarios. Hasta ahora, nuestro equipo de investigación ha analizado el efecto citotóxico y citopático producido por aislados de *R. salmoninarum* en cultivo de ASK-1 (Bethke et al., 2019) y en SHK-1 (Echeverría-Bugueño et al., 2021), pero en este último caso también de sus vesículas de membrana. El seguimiento de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) indica el efecto citotóxico producido por la presencia del patógeno. En el caso de *R. salmoninarum* H-2 generó un nivel de muerte celular significativamente mayor que la cepa tipo DSM 20767 a partir de las 12 horas post infección (Bethke et al., 2019), por lo que la patogenicidad es dependiente del aislado analizado. Además, tras 24 horas de infección se visualizó por microscopía óptica el efecto

citopático producido por H-2 y DSM 20767, observándose una mayor pérdida de morfología y desapego celular cuando las bacterias se crecieron en condiciones limitantes de hierro (Bethke et al., 2019).

En cuanto a las vesículas de membrana, solo se ha evaluado la cepa H-2 (Echeverría-Bugueño et al., 2021), el cual fue seleccionado debido a su alta capacidad de producir sideróforos, siendo clasificado como una cepa altamente virulenta (Bethke et al., 2016). Se han propuesto mecanismos asociados al cómo las vesículas extracelulares median los procesos de captación de hierros, uno de ellos es encapsulando sideróforos (Caruana & Walper, 2020). Como se señaló previamente, en condiciones no limitantes de hierro la patogenicidad exhibida por las vesículas de la cepa H-2 provocó un incremento de hasta 6 veces en los niveles de LDH comparados con la bacteria. Además, las células de peces exhiben un comportamiento de infección más agresivo (Echeverría-Bugueño et al., 2021).

Gran parte de los estudios se han llevado a cabo mayoritariamente evaluando solo las células de *R. salmoninarum* H-2 y cepa tipo en condiciones *in vitro* y crecidas sin limitación de hierro, por tanto,

Figura 3: Presencia de sideróforos en placas agar CAS en las vesículas de membrana de *R. salmoninarum* extraídas del cultivo en KDM-2



falta por determinar el rol de las vesículas de membrana en el funcionamiento patológico *in vivo* e *in vitro*, muy especialmente cuando la bacteria se crece en condiciones de limitación de hierro. Estos

numerosos resultados han permitido la reciente adjudicación del Proyecto FONDECYT Postdoctoral N°3230453 que presenta como hipótesis "En condiciones limitantes de hierro, *R. salmoninarum* aumenta la producción de vesículas de membrana, las cuales contienen abundantemente p22 y p57, evidenciándose conjuntamente un aumento en la secreción de proteínas asociadas a los sistemas de captación de hierro lo que provoca un mayor potencial patológico para los ejemplares de salmón del Atlántico cuando son infectados con estas vesículas de membrana" y esperamos prontamente compartir el conocimiento generado, dilucidando si existe o no correlación entre distintos mecanismos de virulencia. Todo ello podría servir de base para futuros avances contra la enfermedad renal bacteriana, especialmente en el diseño y desarrollo de tratamientos dirigidos el uso de las vesículas de membrana de *R. salmoninarum*, lo que representa un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento de esta bacteria exigente y persistente.

Bibliografía

- Avendaño-Herrera, R., Saldivia, P., Bethke, J., Vargas, C., & Hernández, M. (2022). Proteomic analysis reveals *Renibacterium salmoninarum* grown under iron-limited conditions induces iron uptake mechanisms and overproduction of the 57-kDa protein. *Journal of Fish Diseases*, 45(2), 289-300. <https://doi.org/10.1111/jfd.13554>
- Bethke, J., Arias-Muñoz, E., Yáñez, A., & Avendaño-Herrera, R. (2019). *Renibacterium salmoninarum* iron-acquisition mechanisms and ASK cell line infection: Virulence and immune response. *Journal of Fish Diseases*, 42(9), 1283-1291. <https://doi.org/10.1111/jfd.13051>
- Bethke, J., Poblete-Morales, M., Irgang, R., Yáñez, A., & Avendaño-Herrera, R. (2016). Iron acquisition and siderophore production in the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Fish Diseases*, 39(11), 1275-1283. <https://doi.org/10.1111/jfd.12456>
- Bethke, J., Quezada, J., Poblete-Morales, M., Irgang, R., Yáñez, A., Oliver, C., & Avendaño-Herrera, R. (2017). Biochemical, serological, and genetic characterisation of *Renibacterium salmoninarum* isolates recovered from salmonids in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 4(37). <https://www.researchgate.net/publication/319303841>
- Brown, J. S., & Holden, D. W. (2002). Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes and Infection*, 4, 1149-1156. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01640-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01640-4)
- Caruana, J.C., & Walper, S.A. (2020). Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe-microbe and microbe-community interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00432>
- Coady, A. M., Murray, A. L., Elliott, D. G., & Rhodes, L. D. (2006). Both msa genes in *Renibacterium salmoninarum* are needed for full virulence in bacterial kidney disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2672-2678. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2672-2678.2006>
- Delgandi, M.R., El-Matbouli, M., & Menanteau-Ledouble, S. (2020). *Renibacterium salmoninarum*-The causative agent of Bacterial Kidney Disease in salmonid fish. *Pathogens*, 9, 845. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100845>
- Echeverría-Bugueño, M., Balada, C., Irgang, R., & Avendaño-Herrera, R. (2021). Evidence for the existence of extracellular vesicles in *Renibacterium salmoninarum* and related cytotoxic effects on SHK-1 cells. *Journal of Fish Diseases*, 44(7), 1015-1024. <https://doi.org/10.1111/jfd.13362>
- Eichenbaum, Z., Green, B. D., & Scott, J. R. (1996). Iron starvation causes release from the Group A Streptococcus of the ADP-ribosylating protein called plasmin receptor or surface glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase. *Infection and Immunity*, 64(6), 1956. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.1956-1960.1996>
- Evelyn, T. P. T., Bell, G. R., Prosperi-Porta, L., & Ketcheson, J. E. (1989). A simple technique for accelerating the growth of the kidney disease bacterium *Renibacterium salmoninarum* on a commonly used culture medium (KDM2). *Disease of Aquatic Organisms*, 7, 231-234. <https://doi.org/10.3354/dao007231>
- Evelyn, T. P. T., Prosperi-Porta, L., & Ketcheson, J. E. (1986). Experimental intra-ovum infection of salmonid eggs with *Renibacterium salmoninarum* and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite their treatment with erythromycin. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1, 197-202.
- Fredriksen, Å., Endresen, C., & Wergeland, H. I. (1997). Immunosuppressive effect of a low molecular weight surface protein from *Renibacterium salmoninarum* on lymphocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 7, 273-282. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0082>
- Grayson, T. H., Bruno, D. W., Evenden, A. J., Gilpin, M. L., & Munn, C. B. (1995). Iron acquisition by *Renibacterium salmoninarum*: contribution of iron reductase. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22, 157-162. <https://doi.org/10.3354/dao022157>
- Gudmundsdóttir, S., Helgason, S., & Benediksdóttir, E. (1991). Comparison of the effectiveness of three different growth media for primary isolation of *Renibacterium salmoninarum* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish. *Journal of Fish Diseases*, 14, 89-96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00579.x>
- Hamed, B. S., Tavares Ranzani-Paiva, M. J., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Ishikawa, C. M., & Esteban, M. A. (2018). Fish pathogen bacteria: adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 80, 550-562. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.053>
- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 525-537. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2836>
- Ibieta, P., Tapia, V., Venegas, C., Hausdorf, M., & Takle, H. (2011). Chilean Salmon Farming on the Horizon of Sustainability: Review of the Development of a Highly Intensive Production, the ISA Crisis and Implemented Actions to Reconstruct a More Sustainable Aquaculture Industry. In *Aquaculture and the Environment - A Shared Destiny* (pp. 215-248). <https://doi.org/10.5772/30678>
- Kroniger, T., Flender, D., Schlüter, R., Köllner, B., Trautwein-Schult, A., & Becher, D. (2022). Proteome analysis of the Gram-positive fish pathogen *Renibacterium salmoninarum* reveals putative role of membrane vesicles in virulence. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06130-w>
- Lemos, M. L., & Balado, M. (2020). Iron uptake mechanisms as key virulence factors in bacterial fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 129(1), 104-115. <https://doi.org/10.1111/jam.14595>
- Rhodes, L. D., Coady, A. M., & Deinhard, R. K. (2004). Identification of a third msa gene in *Renibacterium salmoninarum* and the associated virulence phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6488-6494. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6488-6494.2004>
- Sanders, J. E., & Barros, M. J. (1986). Evidence by the fluorescent antibody for the occurrence of *Renibacterium salmoninarum* among salmonid fish in Chile. *Journal of Wildlife Diseases*, 2(22), 255-257. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-22.2.255>
- SERNAPESCA. (2021). Informe Sanitario con Información Sanitaria de Agua Dulce y Mar Año 2021.
- SERNAPESCA. (2020). Resultados Programa Sanitario Específico de Vigilancia de Peces y Moluscos y Reproductores Salmonídeos.
- Wiens, G. D., Rockey, D. D., Wu, Z., Chang, J., Levy, R., Crane, S., Chen, D. S., Capri, G. R., Burnett, J. R., Sudheesh, P. S., Schipma, M. J., Burd, H., Bhattacharyya, A., Rhodes, L. D., Kaul, R., & Strom, M. S. (2008). Genome sequence of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum* suggests reductive evolution away from an environmental *Arthrobacter* ancestor. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 6970-6982. <https://doi.org/10.1128/JB.00721-08>

EL SOCIO LÍDER DE LA ACUICULTURA SOSTENIBLE, CON ORIGINALIDAD Y CONTINUIDAD POR MÁS DE 40 AÑOS DE EXPERIENCIA



UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA Y RECURSOS AGROALIMENTARIOS

- **DESARROLLO**
- **DIVERSIFICACIÓN**
- **INNOVACIÓN**
- **AJUSTES DE TECNOLOGÍAS**
- **OPTIMIZACIÓN**
- **ACUICULTURA Y AGRICULTURA**
- **ACUICULTURA DE PEQUEÑA ESCALA**
- **REPOBLAMIENTO PARA LA PESCA ARTESANAL**

INVESTIGACIÓN I+D+I

TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

DOCENCIA

**INGENIERÍA EN ACUICULTURA
SOSTENIBLE (2024)**

PECES - MOLUSCOS - ALGAS - PESCA RECREATIVA - AMBIENTE - ALIMENTOS



FONDEF
Fondo de Fomento al Desarrollo
Científico y Tecnológico



Subsecretaría
de Pesca



Alberto Medina A. • e-mail: amedina@ulagos.cl; respinoza@ulagos.cl; jcuribe@ulagos.cl • (56-64) 2333303 - 18 - 19
Campus Chuyaca • Avda. Fuchslocher N°1305 • Pabellón Lago Riñihue • Osorno • Región de los Lagos

Desempeño en campo de BEKA-VAX[®], una nueva vacuna contra *Renibacterium salmoninarum*



Kurt Pohlhammer Serey, Tomás Cancino Díaz, Loreto Tapia Díaz, Iván Valdés Valdivia, Luis Montoya Barra.

Renibacterium salmoninarum, agente causal de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD, por su sigla en inglés - Bacterial Kidney Disease). Es una bacteria que generalmente se presenta en forma de diplobacilos y es de crecimiento lento y fastidioso, siendo este uno de los principales problemas del método de cultivo y un inconveniente para los programas de control de la salud (Benediktsdóttir, Helgason, & Gudmundsdóttir, 1991). Su tiempo de incubación suele variar entre 18 a 21 días hasta 6 a 9 semanas a 12-15°C, en medio definido (Austin, 1985) (Daly & Stevenson, 1993).

BKD es una patología que causa mortalidad en los peces, tanto en su estado natural como en salmónidos de cultivo, afectando las etapas productivas en agua dulce y engorda en agua de mar, con infecciones lentas y progresivas, especialmente en aguas frías (Fyer & Sanders, 1981) (Alcorn, Murray, Pascho, & Varney, 2005). Típicamente, *R. salmoninarum* al inicio de la enfermedad no presenta síntomas externos bien definidos en los peces, los que si se manifiestan en forma muy visible en las etapas avanzadas de la enfermedad, branquias pálidas, hemorragia en áreas cercanas a las aletas, decoloración de la piel y abdomen distendido (Fyer & Sanders, 1981) (Bruno, 1986) (Hirvelä-Koski, Pohjanvirta, Koski, & Sukura, 2006), e incluso exoftalmia severa bilateral, hemorragia sub opercular, abultamientos y úlceras en casos agudos. Esto ocurre en forma más prevalente cuando los peces permanecen en agua dulce y a baja temperatura.

En cuanto a síntomas internos, la enfermedad se presenta mediante lesiones nodulares focales o multifocales en el riñón, bazo y/o hígado, líquido en la cavidad abdominal, hemorragia en el abdomen o vísceras y una capa membranosa en los órganos internos (Bruno, 1986). Una de las grandes preocupaciones para los productores de peces es que esta enfermedad se transmite tanto en forma horizontal como vertical, siendo esta última una inquietud permanente en el monitoreo de las poblaciones de peces destinados a reproducción.

La prevención de esta enfermedad mediante vacunas ha sido controversial, por cuanto los resultados han sido variables y en general las vacunas basadas en patógenos bacterianos inactivados han demostrado ser muy eficaces en peces (Somerset, Krossøy, Biering, & Frost, 2005), sin embargo, los tratamientos y enfoques

convencionales de vacunas no son efectivos contra *R. salmoninarum*, ya que no está clara la relación entre la habilidad de producir anticuerpos y la protección contra el patógeno (Alcorn, Murray, Pascho, & Varney, 2005).

Para el control eficaz de esta enfermedad, Veterquímica trabajó por varios años en la investigación y desarrollo de esta vacuna

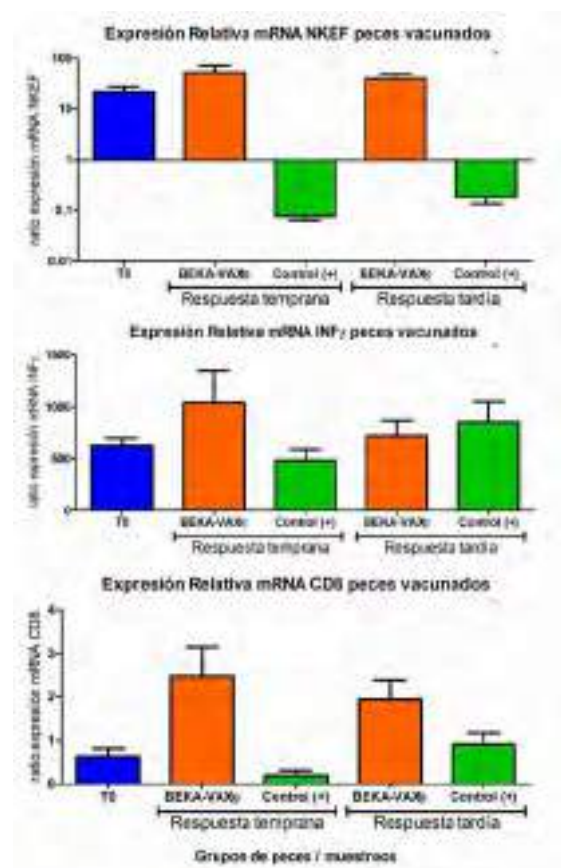


Figura 1: Expresión relativa de ARN mensajero de moléculas asociadas a la respuesta inmunológica. A) Factor de aumento de células Natural Killer (NKEF), B) Interferón-γ (INF-γ), C) Población de linfocitos T CD8.

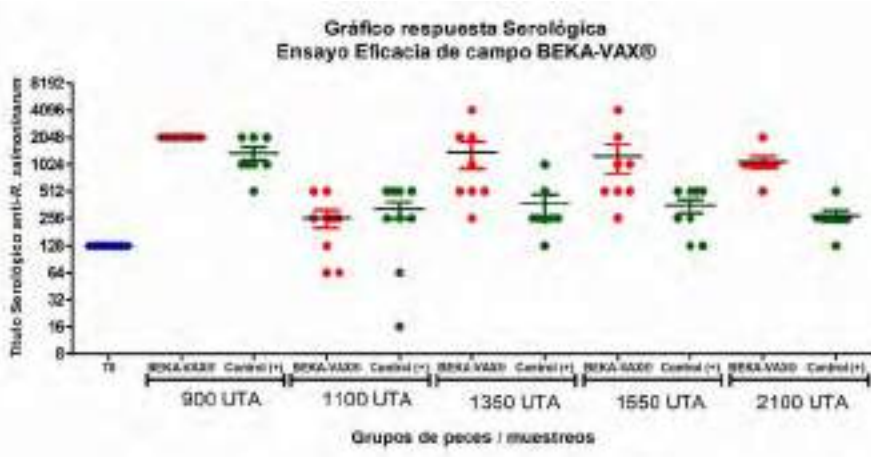


Figura 2: Respuesta serológica de peces vacunados con BEKA-VAX® y la vacuna Control (+) en distintos tiempos de muestro.



Figura 3: Porcentaje de mortalidad semanal en función del total de peces a la siembra en todas las jaulas en estudio.

(BEKA-VAX) obteniendo registro SAG definitivo en el año 2020 (Reg. SAG 2479 -B), incluyendo antígenos locales capaces de estimular la inmunidad activa contra *R. salmoninarum*.

Su capacidad protectora ha sido demostrada tanto en estudios a escala de laboratorio, como también en prueba de eficacia en campo, bajo la supervisión del SAG en la región de Magallanes donde existe obligatoriedad de vacunación contra el patógeno causante de BKD (RESA SERNAPESCA N° 6246, 19 diciembre 2017), esto como parte del programa sanitario general de vigilancia y control para la región de Magallanes y Antártica chilena.

BEKA-VAX®, una solución para BKD en Chile. Mortalidades de la industria

En Chile el BKD por muchos años pasó algo desapercibido en la salmonicultura local, sobre todo en las etapas de agua dulce, sin embargo, hoy en día su prevalencia ha ido en aumento, principalmente en la región de Magallanes. Allí la prevalencia y mortalidades son mucho más altas que en las otras regiones donde se realiza cultivo, según los últimos reportes de mortalidad año 2022-2023, el 23,4 % es por causas infecciosas donde el 45,7% solo corresponde a BKD en la especie *Salmo salar*, mientras que, en truchas para el mismo periodo de tiempo, el 30,3% es por causas infecciosas y de este valor el 83,6% es solo por BKD.

BEKA-VAX®, (figura 5) es una vacuna inactivada inyectable que ingresó al mercado nacional en enero del 2021, es un producto autólogo, generado a partir de cepas nacionales de *Renibacterium salmoninarum*, la cual está registrada para ser usada en todas las especies de cultivo tradicional en Chile, a la fecha se contabilizan más de 50 millones de peces vacunados bajo la modalidad de aplicación simple o combinada en las distintas regiones del país.

La vacuna BEKA-VAX® ha pasado por muchas pruebas de eficacia y seguridad, tanto en condiciones controladas en su fase de desarrollo, como también en la etapa campo, en donde ya llevamos más de 10 meses aplicando el producto y con

peces sembrados en agua de mar acumulando a la fecha más de 2.400 UTAs post vacunación.

De acuerdo a los antecedentes recogidos en campo, respecto a la seguridad de la vacuna BEKA-VAX®, tanto en niveles de adherencia como melanosis, hasta ahora la vacuna demostró ser muy segura. No se han observado mayores efectos que los que se han generado históricamente por las vacunas múltiples por sí solas, considerando ahora incluso la aplicación en forma conjunta. Estos resultados dan cuenta de las evaluaciones realizadas en nuestro laboratorio, como también en laboratorios externos y se conciben con información obtenida en las pruebas realizadas durante el desarrollo de la vacuna respecto a su seguridad.

En relación a las respuestas serológicas que se han observado en distintas especies y grupos que han sido vacunados con BEKA-VAX®, hasta ahora, queda en evidencia que existe una correcta inducción y montaje de respuesta inmune específica frente a *Renibacterium salmoninarum*, observándose títulos serológicos altos previo la salida de los peces al mar, los que posteriormente y de manera normal descienden a medida que transcurre el tiempo, para volver a presenciar aumentos en la secreción de anticuerpos, cuando los peces se ven enfrentados al patógeno

Aplicación de la vacuna

Respecto a la aplicación de la vacuna BEKA-VAX®, en campo nos hemos encontrado con distintos procesos y forma de aplicación. Hemos aplicado la vacuna bajo aplicación simple y única, bajo doble aplicación en dos mesas de vacunación y bajo el esquema de una aplicación con doble sonda.

Todas estas alternativas de acuerdo al esquema productivo de cada compañía y en combinación con distintos productos inmunológicos, sin presentar aumento en los efectos secundarios sino más bien, los mismos registrados por la aplicación simple de las vacunas utilizada en la industria hasta ahora (Figura 6).

Resultados Inmunológicos y protectivos contra *R. salmoninarum*

a) Medición de marcadores moleculares:

Estos se realizan mediante la medición de la "expresión relativa de ARN mensajero de moléculas asociadas a la respuesta inmunológica"

Para determinar la respuesta inmune celular, se muestrearon peces post vacunación, en 2 momentos para evaluar respuesta temprana y respuesta tardía (días 3 y 7)

Se extrae ARN de muestras de cabeza de riñón y bazo de los peces en estudio. Con esto, se evaluó la expresión relativa de las ARNm de citoquinas NKEF e INF- γ además de la población celular de linfocitos T CD8, los cuales están asociados a la respuesta inmune citotóxica, la cual es requerida para proteger a los individuos de una infección intracelular, mecanismo utilizado por *R. salmoninarum*.

En la Figura 1A se observa la expresión relativa del factor de aumento de las células *Natural Killer*, el cual es secretado por los macrófagos como respuesta a una estimulación intracelular. En este caso se puede ver una sobrerregulación de la expresión de este factor en los peces vacunados con BEKA-VAX®, tanto en los estados tempranos como en los tardíos, a diferencia de la vacuna Control (+), en donde se observa una disminución de la expresión relativa de este factor.

La citoquina INF- γ es expresada por las células linfocitarias para comunicar la existencia de una infección intracelular, con lo cual se activan los macrófagos para que eliminen los agentes intracelulares que tienen fagocitados. En la Figura 1B se observa que todos los peces vacunados presentan una sobrerregulación de INF- γ . Para el caso de BEKA-VAX® se tiene que, tanto en la respuesta temprana como en la tardía, existe un aumento en la expresión de este factor con respecto al T0, a diferencia del Control (+), en donde sólo en la respuesta tardía se ve este resultado, lo cual probablemente se debe a la naturaleza de esta vacuna. A pesar de que todas estas diferencias no son estadísticamente significativas, se observa una tendencia biológica.

Finalmente, Los resultados de los análisis de las poblaciones CD-8 demuestran una inducción de la expresión de los ARN mensajeros de los peces vacunados con BEKA-VAX®, tanto en períodos tempranos post-vacunación, como en períodos tardíos, lo que indica que estos peces vacunados fueron

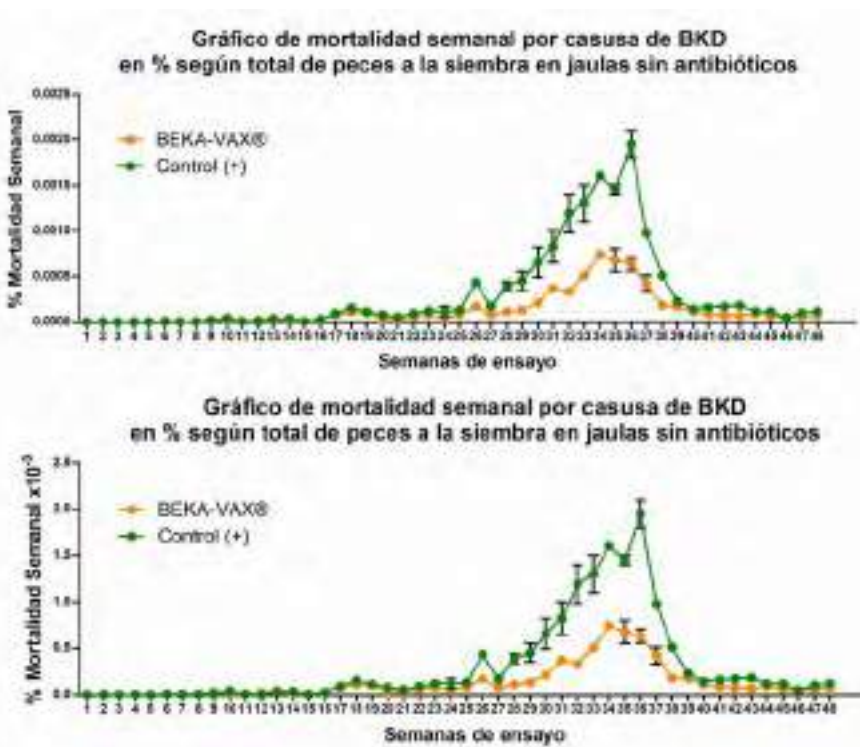


Figura 4: Porcentaje de mortalidad semanal en función del total de peces a la siembra en las jaulas en estudio que no recibieron tratamiento con antibióticos.

estimulados su sistema inmune celular. CD-8 se estudia porque es la población de células encargadas directamente de eliminar patógenos intracelulares, como *Renibacterium*. Por lo tanto, si una vacuna logra estimular esta porción de células, sugiere que está haciendo una presentación de antígenos cruzada, tanto por vía extracelular como intracelular, lo que ayudará en la futura defensa del organismo contra el agente patogénico.

b) Respuesta serológica, anticuerpos específicos contra *Renibacterium salmoninarum*.

El análisis de los títulos serológicos anti- *R. salmoninarum* se realizó mediante prueba de ELISA, para esto se utilizaron sueros de peces inmunizados de los distintos grupos a distintos tiempos de muestreo (T0, pre-traslado a mar y post-traslado). La placa ELISA fue activada con un péptido específico, diseñado por bioinformática, que corresponde a una fracción de la proteína P57 de *Renibacterium salmoninarum*, lo cual le otorga especificidad a la prueba y los sueros en análisis, lo que además garantiza el seguimiento de la respuesta serológica de los peces hacia el futuro.

Los títulos serológicos de ambos grupos vacunados resultaron ser mayores respecto del tiempo 0 a 900 UTA post vacunación, que fue el muestreo previo a traslado a mar, y este punto correspondió al máximo de respuesta serológica de los peces en estudio (Figura 2). Previo a traslado a mar, la diferencia en los títulos serológicos entre los grupos de BEKA-VAX® y la vacuna Control (+) no difieren de forma estadísticamente significativa entre sí, pero sí es posible observar una mejor homogeneidad en la secreción de anticuerpos (títulos serológicos) contra *R. salmoninarum* en el grupo vacunado con BEKA-VAX®, respecto de los peces vacunados con el Control (+). Adicionalmente, este mismo fenómeno se ve en la medida que pasa el tiempo en mar, por lo tanto, se puede presumir que existe una memoria inmunológica contra el patógeno en los peces inmunizados, siendo los títulos serológicos de los peces vacunados con BEKA-VAX®, siempre mayores y más homogéneos que los peces vacunados con el Control (+), estas diferencias son estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis: 62,21; p value < 0,0001).

Es interesante mencionar que en la Figura 2 se aprecia una disminución en el título serológico de los peces a las 1100 UTAS (aproximadamente 45 días post traslado a mar), sin embargo, en los siguientes muestreos el título serológico aumentó, lo cual coincide con observaciones del centro de cultivo en que se observó una mayor signología contra la enfermedad (aumento mortalidad semanal por *R. salmoninarum*). Sin embargo, el grupo que aumentó de manera significativa fue en los peces vacunados con BEKA-VAX®, lo que permitiría reafirmar que los

peces vacunados con esta formulación adquirirán memoria inmunológica.

c) Análisis de morbilidad y mortalidad

La presencia del patógeno o enfermedad se reduce en forma significativa en poblaciones vacunadas con BEKA-VAX®, siendo detectada la presencia del patógeno hasta 40 semas post transferencia a agua de mar, pero con peces sin hallazgos de signos clínicos de la enfermedad (esto es sin daños en riñón). Esto se ha obtenido en diferentes grupos de peces vacunados en 2021.

En cuanto a mortalidades por BKD, la diferencia a favor de peces vacunados es una significativa reducción de la mortalidad de un 20%. Aunque esta diferencia, en el período comprendido entre las semanas 25 y 39 del ensayo no es estadísticamente significativa (Kruskal-Wallis: 62,21; p value = 0,1185), sí existe una tendencia biológica, incluso en este caso, donde existió un brote agudo de la enfermedad en el campo. Por otro lado, al hacer un análisis de área bajo la curva de los datos mostrados en la Figura 3, se obtiene que la razón entre este parámetro del Control (+) y los grupos vacunados con BEKA-VAX® es de 1,20, lo que se traduce en una protección un 20% más efectiva contra *R. salmoninarum* al utilizar la vacuna producida por Veterquímica. Cabe destacar que esta diferencia no se explicaría a lo ocurrido en las jaulas sin tratamiento con antibióticos, puesto que la mayor diferencia en el porcentaje de mortalidad en la totalidad de las jaulas es de aproximadamente un 0,1% semanal, y en el caso de las jaulas sin tratamiento, la mayor diferencia es cercana a un 0,015% en una semana.

Conclusión

En relación a los análisis de la respuesta inmune de los peces en estudio, se realizó un análisis de marcadores moleculares celulares y una cinética de respuesta humoral específica contra el patógeno. Ambos ensayos mostraron que la vacuna BEKA-VAX® es capaz de estimular el sistema inmune al activar rutas celulares (aumento de CD8, NKEF e INF-?) y aumentar el título de anticuerpos específicos contra *Renibacterium salmoninarum* en comparación al grupo control.

Respecto a la mortalidad de los peces sin tratamiento de antibiótico se destaca que el grupo vacunado con BEKA-VAX® presenta mortalidades menores estadísticamente significativas respecto al control positivo a la semana 48, lo que se relaciona con una protección mayor contra la enfermedad bacteriana del riñón.



Figura 5: Vacuna BEKA-VAX®.

Todos los resultados de las pruebas de eficacia indican que la vacuna BEKA-VAX® de la empresa Veterquímica S.A., es eficaz como ayuda en la prevención de la enfermedad bacteriana del riñón. Demostrando una inmunidad de más de 1800 UTA en condiciones de campo en peces no sometidos a tratamientos con antibióticos.

Referencias

Alcorn, S., Murray, A., Pascho, R., & Varney, J. (2005).

A cohabitation challenge to compare the efficacies of vaccines for bacterial kidney disease (BKD) in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63:151-160, doi:10.3354/dao063151.

Austin, B. (1985). Evaluation of antimicrobial compounds for the control of bacterial kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 8, 209-220. doi:10.1111/j.1365-2761.1985.tb01216.x.

Benediktsdóttir, E., Helgason, S., & Gudmundsdóttir, S. (1991). Incubation time for the cultivation of *Renibacterium salmoninarum* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodfish. *Journal of Fish Diseases*, 14 1 97-102, doi: 10.1111/j.1365-2761.1991.tb00580.x.

Bruno, D. (1986). Histopathology of bacterial kidney disease in laboratory infected rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, and atlantic salmo, *salmo salar*, with reference to naturally infected fish. *Journal of Fish Diseases*, 9(6):523 - 537, DOI:10.1111/j.1365-2761.1986.tb01049.x.

Daly, J., & Stevenson, R. (1993). Nutrient Requirements of *Renibacterium salmoninarum* on Agar and in Broth Media. *Applied and environmental microbiology*, 59(7), 2178-2183. <https://doi.org/10.1128/aem.59.7.2178-2183.1993>.

Fyer, J., & Sanders, J. (1981). bacterial kidney disease of salmonid fish. *Annual reviews Microbiology*, 35:273-98, DOI: 10.1146/annurev.mi.35.100181.001421.

Hirvelä-Koski, V., Pohjanvirta, T., Koski, P., & Sukura, A. (2006). Atypical growth of *Renibacterium salmoninarum* in subclinical infections. *Journal of fish diseases*, 29(1), 21-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00677.x>.

Mitchum, D., & Sherman, L. (1981). Transmission of bacterial kidney disease from wild to stocked hatchery trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(5), 547-551, DOI: 10.1139/f81-077.

Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*, 4(1), 89-101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>.



Figura 6:

Aplicaciones en campo
Vacuna BEKA-VAX®.



SERVICIOS

Servicio de aislación térmica

Instalación de porcelanato hospitalario

Cierres sanitarios

Hojalatería para aislación térmica

Construcción de mamparas de vidrio para aislación
médica y plantas de alimentos

Servicios de emergencia 24/7

Construcción y mantención en general

Constructora e inmobiliaria
Santa Adriana spa

Gerente Comercial +56 9 7790 2942
Jefe Técnico +5699 3001 3444

Fono 64 220 7567

José María Sotomayor 71
Osorno



- *Fundas - Láminas*
- *Bolsas net-bag para redes*
- *Insumos para selladoras*
- *Cintas de canalización*
- *Mangas polietileno e Invernadero*
- *Rollos prepicado*
- *Mallas raschel*
- *Bolsas basura*
- *Malla faenera*
- *Bolsas vacío*
- *Bolsas bins*



FONOS 65 228 6420 65 228 6416 +569 5411 9904
 PARCELA 22 ALTO LA PALOMA PUERTO MONTT
 MARCELA.CARDENAS@PLASTICOSAUSTRAL.CL WWW.PLASTICOSAUSTRAL.CL

Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV):

Explorando estrategias para identificar nuevas proteínas virales inmunogénicas para la producción de vacunas (o como adelantarse a las amenazas de un virus RNA)

Valentina Wong vwongbenito@uwaterloo.ca; valentina.wong@usach.cl
 Ruth Montero ruth.tamara.montero.meza@nmbu.no
 Mónica Imarai monica.imarai@usach.cl

La producción acuícola debe constantemente enfrentar la aparición de brotes de variadas enfermedades infecciosas en los peces. La vacunación rutinaria que estimula la inmunidad en los peces es una de las principales estrategias de prevención, sin embargo, la capacidad de los microorganismos de generar **nuevas variantes y de evadir el sistema inmunológico** explican en gran parte el que los peces siguen siendo vulnerables a las infecciones conocidas, nuevas y reemergentes. Uno de los virus que infectan a los peces en cultivo es el **virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)**, perteneciente al género Aquabirnavirus y a la familia Birnaviridae. Este virus se caracteriza por tener un RNA de doble cadena (birnavirus) y un genoma bisegmentado (dsRNA), el cual está contenido dentro de una partícula viral sin envoltura [1]. La necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad mortal altamente contagiosa que afecta a peces salmónidos. Aunque el número de brotes se ha reducido en la última década por el uso de reproductores que son resistentes en base a un QTL (Quantitative Trait Locus) [2, 3], la aparición de nuevas variantes (típica de los virus RNA) y los informes de brotes masivos en la trucha arcoíris son evidencia de que el IPNV sigue amenazando a la industria acuícola en el mundo [4-6].

En la actualidad existen varias vacunas contra IPNV que contienen proteínas recombinantes, DNA o basadas en partículas virales (VLP) [7, 8]. Sin embargo, la mayoría de las vacunas utilizadas en Chile son vacunas de virus inactivado y en su mayoría incluyen otros microorganismos patógenos (Servicio Agrícola y Ganadero). Estas vacunas estimulan el sistema inmunitario induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes; sin embargo, parece

evidente que éstas aún necesitan mejoras importantes ya que no son lo suficientemente protectoras para eliminar el virus y ninguna de ellas evita los brotes, que continúan apareciendo incluso en salmónidos seleccionados por QTL [6]. Es interesante destacar que los estudios de vacunas anti-IPNV demuestran que dentro de las proteínas que conforman IPNV, VP2 es la proteína inmunogénica (la que produce respuestas) contra la cual se inducen anticuerpos neutralizantes. VP2 puede conferir diferentes grados de protección según el sistema de administración de antígenos y el diseño de

la vacuna. Por lo general, los antígenos seleccionados para formulación de vacunas de subunidad son típicamente proteínas de la cápside viral (Figura 1) ya que los anticuerpos que se producen contra ellas (idealmente anticuerpos neutralizantes) interfieren con la unión del virión a los receptores celulares, o evitan que los genomas se liberen al citoplasma.

Recientemente hemos estudiado la capacidad de nuevas proteínas de IPNV de inducir una buena respuesta inmunológica en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [9]. Con las herramientas disponibles, se evaluó la respuesta inmunológica de linfocitos T CD4 contra estos antígenos proteicos de IPNV, para poder inferir si se induce una respuesta de tipo

celular, que en los mamíferos activa a **linfocitos T CD8 y macrófagos**. Estas últimas poblaciones celulares son llamadas efectoras porque son capaces de eliminar a los microorganismos patógenos, que como los virus, se esconden dentro de las células que infectan. Para poder identificar este tipo de respuesta, analizamos los niveles de un grupo de RNA mensajeros que son **marcadores de la respuesta celular** (Tabla 1) en el riñón anterior

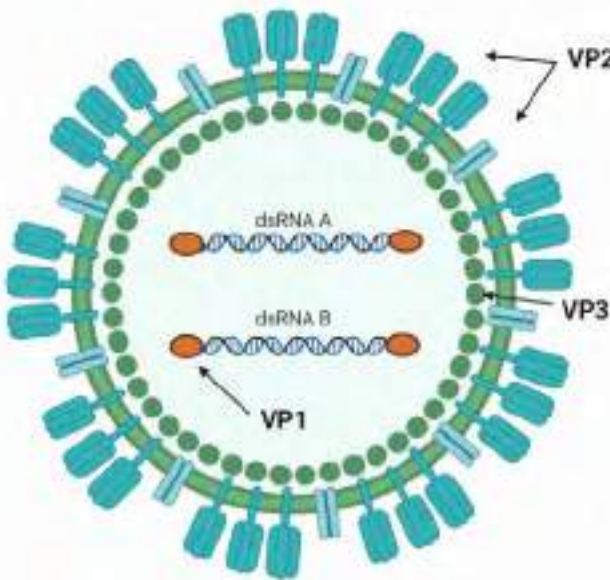


Figura 1: Esquema de la estructura del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). Se indican las proteínas estructurales VP2 y VP3 y la proteína no estructural VP1.

de los peces, órgano donde se produce, entre otros eventos, respuesta inmune a las infecciones. Así evaluamos la respuesta inmune contra dos proteínas del virus de la necrosis pancreática infecciosa en la trucha arcoíris, la RNA polimerasa asociada al virión, denominada VP1 y VP2-Flagelina (VP2-Flg), una proteína de fusión hecha con flagelina de *Aeromonas salmonicida*. Dado que VP1 no es una proteína de la cápside viral (no-estructural, Figura 1), pensamos que podría inducir inmunidad celular, como sucede con muchas de las nucleoproteínas virales. Además siendo una proteína de gran tamaño, se espera una mejor respuesta inmunitaria. Por otro lado, la construcción de una proteína de fusión VP2-Flg, que incluye la proteína de la cápside VP2 y otra altamente inmunogénica como la flagelina de una bacteria que también afecta a los salmones, podría mejorar la respuesta ya observada contra VP2. Flagelina había sido anteriormente usada como adyuvante en peces.

El experimento principal de este estudio consistió en inmunizar un grupo de peces (trucha arcoíris) con la proteína VP1 obtenida como recombinante desde *Escherichia coli* (rVP1), o con la proteína de fusión VP2-Flg, vía intraperitoneal. Las proteínas se inyectaron 3 veces cada 15 días (días 0, 15 y 30). Un grupo de peces se mantuvo como control, inyectado solo con el medio que contenía las proteínas y el adyuvante Montanide™ (Figura 2). Al día 33, se obtuvieron las muestras de riñón anterior para los análisis de expresión de los genes en PCR de tiempo real, RT-qPCR. Este método permite medir o cuantificar el nivel de RNA mensajero de los genes de interés (Tabla 1). Los resultados mostraron que rVP1 aumentó la expresión de los genes propios de una respuesta inmune de tipo Th1, esto comparado con los niveles encontrados en las muestras de los peces controles (Tabla 2). Este tipo de respuesta es la que se espera para una proteína que tiene posibilidades de activar la respuesta inmune celular. También aumentó la expresión de los genes relacionados a la respuesta Th2, que se relaciona, no solo a respuesta humoral, sino también a reparación de los tejidos (Tabla 2). Finalmente, rVP1 también aumentó la expresión de los genes involucrados en regulación, respuesta que es siempre bienvenida para controlar el proceso inflamatorio, evitando el daño innecesario al hospedero, en este caso, a los peces (Tabla 2).

Tipo de respuesta inmunitaria	Genes marcadores	Nombre
Respuesta tipo Th1	<i>ifn-γ</i>	Interferón gamma o inmune, IFN-γ
	<i>il-12p40</i>	Cadena p40 de interleuquina 12, IL-12
	<i>t-bet</i>	Factor de transcripción maestro T-bet
Respuesta tipo Th2	<i>il-4/13a</i>	Interleuquina 4/13A, IL-4/13A
	<i>il-4/13b2</i>	Interleuquina 4/13B2, IL-4/13B2
	<i>gata3</i>	Factor de transcripción maestro GATA-3
Respuesta tipo inmunosupresor	<i>il-10a</i>	Interleuquina 10A, IL-10A
	<i>tgf-β1</i>	Factor de crecimiento transformante beta, TGFβ1
Proliferación de linfocitos T	<i>il-2</i>	Interleuquina 2, IL-2

Tabla 1: Genes marcadores de respuesta celular en la trucha arcoíris

	Genes marcadores	Tipo de respuesta Inmunitaria
Efecto de la inyección de rVP1	<i>ifn-γ</i> ↑	Respuesta de tipo Th1 ↑
	<i>il-12p40</i> ↑	
	<i>t-bet</i> ↑	
	<i>il-4/13a</i> ↑	Respuesta de tipo Th2 ↑
	<i>il-4/13b2</i> ↑	
	<i>gata3</i> ↑	Respuesta de tipo Inmunosupresor ↑
	<i>il-10a</i> ↑	
	<i>tgf-β1</i> ↑	Proliferación de células T ↑
	<i>il-2</i> ↕	

Tabla 2: Expresión de genes marcadores en el riñón anterior de peces inmunizados con rVP1. Las flechas indican aumento, el ícono verde indica que no hay aumento.

La detección de los genes expresados en el riñón anterior de los peces inmunizados no es suficiente evidencia para decir que rVP1 induce una respuesta celular; por lo que identificar las células respondedoras, donde se expresan estos genes es fundamental. Así, primero ensayando con linfocitos del riñón de estos peces inmunizados, y estimulando in vitro con rVP1 (Figura 2), se demostró que cada uno de los peces responde con un perfil de expresión de los genes que es único. Algunos peces respondieron con un aumento moderado en la expresión de las cinco citoquinas analizadas (*il-2a*, *ifn-γ* *il-4/13a*, *il-10a* y *tgf-β1*), mientras que las células del pez 2 respondieron con un alto aumento en la expresión de *il-2a* solamente, y las células del pez 3 respondieron con una inducción muy alta de *ifn-γ* e *il-4/13a* [9]. También determinamos si células que producen las citoquinas en respuesta a la inmunización con VP1 son linfocitos T helper (o cooperadores) de la trucha. Para ello utilizamos anticuerpos contra la molécula CD4-1+ que es el corresponsor de estos linfocitos y con la ayuda

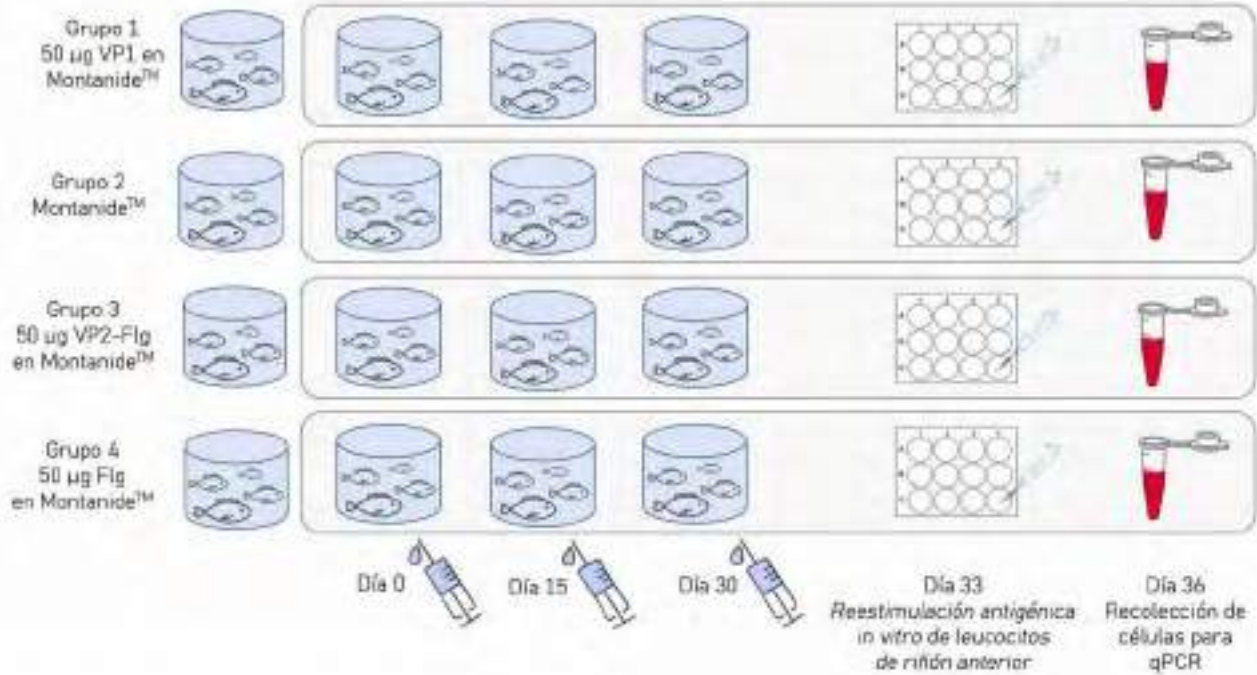


Figura 2: Diseño experimental

de un equipo denominado *Cell Sorter* aislamos estas células desde los leucocitos aislados del riñón de cada pez (Figura 2). Esta vez, las células se obtuvieron de cuatro peces inmunizados con VP1 y tres peces de controles. Al analizar la expresión de los genes marcadores en los linfocitos T CD4-1+ aislados, se observó para cada pez un cambio de los niveles de transcritos en relación con el nivel transcripcional basal en las células del grupo de control (Figura 3). Las células T CD4-1+ produjeron *ifn-γ*, *il-4/13a*, *il-4/13b2*, *il-10a* y *tgf-β1*, pero no para *il-2a*. Además, el perfil de expresión en cuatro peces analizados mostró que la inmunización

desencadena una respuesta de células T única en cada pez, similar a lo obtenido en el ensayo anterior. Así, los linfocitos T de un pez expresaron la mayoría de las citoquinas analizadas, es decir, *il-4/13a*, *il-4/13b2*, *ifn-γ* e *il-10a*. Las linfocitos T de un segundo pez expresaron solo *ifn-γ* e *il-10a*, mientras que las células T de los otros dos solo produjeron *il-10a* o *tgf-β1*. Los resultados indicaron que la inoculación de los peces con rVP1 produce diferenciación de los linfocitos T CD4 y que cada pez responde de manera única a la inyección con rVP1.

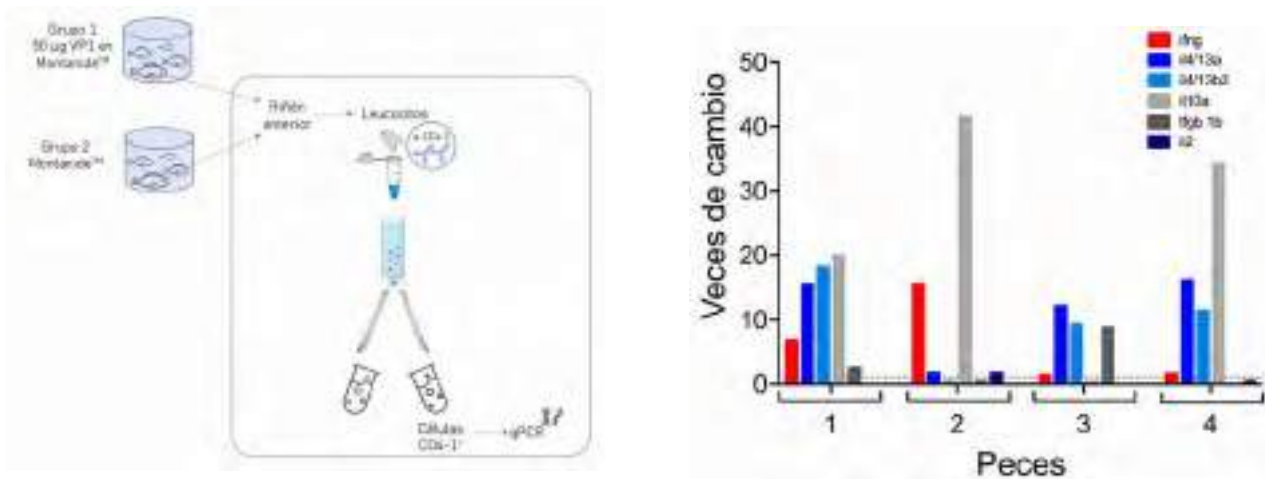


Figura 3: Expresión transcripcional de citoquinas en linfocitos T CD4-1+ de riñón anterior aisladas mediante *cell sorting* de peces inmunizados con VP1. A la izquierda diseño experimental. A la derecha se muestran los resultados de 4 peces analizados.

Los resultados con la proteína de fusión, llevaron a una conclusión inesperada. El perfil de expresión de citoquinas en respuesta a la inoculación de VP2-Flg indujo la expresión de *ifn-γ*, *il-4/13a*, *il-10a* y *tgf-β1*, en relación con los controles adyuvantes, pero por el contrario, la expresión de *il-4/13b2* e *il-2* disminuyó. Más aún, a excepción de *il-4/13a* e *il-2a*, los cambios en los niveles de expresión de los genes marcadores inmunitarios se debieron a la presencia de flagelina en la proteína de fusión. La estimulación antigénica de las células aisladas, confirmó que la mayor respuesta se había producido contra flagelina. La regulación positiva de *ifn-γ*, *il-10* y *tgf-β1* inducida por flagelina de *A. salmonicida* en los peces, indica que esta proteína bacteriana podría usarse como adyuvante para desencadenar una respuesta tipo Th1 en la trucha arco iris, lo que podría ser útil en determinadas circunstancias, por ejemplo, con alguna formulación de vacunas que genera mucha inflamación.

En conjunto, este estudio evalúa por primera vez la respuesta inmune adaptativa inducida por la proteína recombinante VP1 de IPNV y por una proteína de fusión de VP2 con flagelina como parte de la búsqueda de antígenos nuevos o modificados capaces de inducir inmunidad en peces. Los resultados indican que VP1 recombinante es un buen inmunógeno en la trucha arco iris, ya que induce la respuesta tipo Th1, tipo Th2, y regulatoria, que puede implicar la posibilidad de activar la fase efectora celular que lleva a eliminar las células infectadas. En este marco es necesario realizar nuevos estudios para determinar los posibles efectos protectores de este tipo de inmunización. Estos hallazgos abren nuevas oportunidades para nuevos diseños y desarrollo de vacunas contra IPNV. Por otro lado, las propiedades inmunogénicas de la flagelina de *A. salmonicida*, abren la posibilidad de su utilización como adyuvante para las vacunas. De hecho, principalmente en mamíferos, la flagelina de algunas bacterias exhibe actividad adyuvante cuando se usa como proteína recombinante que consta de flagelina fusionada con antígenos heterólogos. En el caso de los peces, aunque se ha demostrado que la flagelina es un buen inmunoestimulante, esta es la primera vez que se evalúa el potencial adyuvante de esta proteína de *A. salmonicida* y como proteína de fusión. El análisis de la respuesta de cada pez permite entender que hay una gran variabilidad en la respuesta a un simple antígeno como rVP1, y muestra que los análisis donde comúnmente los datos son presentados como promedios de las respuestas pueden llevar a desestimar respuestas que aunque minoritarias (en algunos individuos de la población) resultan interesantes y son las esperadas como respuestas protectoras. Si la respuesta deseada existe en la población, el desafío será, entender el mecanismo y diseñar estrategias para que este tipo de respuesta se produzca también en los individuos no respondedores.

Referencias

- [1] C.P. Dopazo, The Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) and its Virulence Determinants: What is Known and What Should be Known, *Pathogens* 9(2) (2020).
- [2] R.D. Houston, C.S. Haley, A. Hamilton, D.R. Guy, A.E. Tinch, J.B. Taggart, B.J. McAndrew, S.C. Bishop, Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Genetics* 178(2) (2008) 1109-15.
- [3] T. Moen, M. Baranski, A.K. Sonesson, S. Kjøglum, 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 (2009) 368.
- [4] L. Zhu, X. Wang, K. Wang, Q. Yang, J. He, Z. Qin, Y. Geng, P. Ouyang, X. Huang, Outbreak of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout in China, *Acta Trop* 170 (2017) 63-69.
- [5] M. Godoy, M.J.T. Kibenge, M. Montes de Oca, J.P. Pontigo, Y. Coca, D. Caro, K. Kusch, R. Suarez, I. Burbulis, F.S.B. Kibenge, Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from Genetically Resistant Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during 2021-2022, *Pathogens* 11(11) (2022).
- [6] J. Benkaroun, K.F. Muir, R. Allshire, C. Tamer, M. Weidmann, Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from a Fish Farm in Scotland, *Viruses* 13(3) (2021).
- [7] M. Goldstein, E. Vallejos-Vidal, V. Wong-Benito, F. Barraza-Rojas, L. Tort, F.E. Reyes-Lopez, M. Imarai, Effects of artificial photoperiods on antigen-dependent immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Shellfish Immunol* 137 (2023) 108759.
- [8] R.B. Shivappa, P.E. McAllister, G.H. Edwards, N. Santi, O. Evensen, V.N. Vakharia, Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system, *Dev Biol (Basel)* 121 (2005) 165-74.
- [9] V. Wong-Benito, F. Barraza, A. Trujillo-Imarai, D. Ruiz-Higgs, R. Montero, A.M. Sandino, T. Wang, K. Maisey, C.J. Secombes, M. Imarai, Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) recombinant viral protein 1 (VP1) and VP2-Flagellin fusion protein elicit distinct expression profiles of cytokines involved in type 1, type 2, and regulatory T cell response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Shellfish Immunol* 131 (2022) 785-795.