Marcela A. ALVAREZ

LA BIOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL COMERCIO DE ANIMALES

Tesis de maestría:
Estudio sobre necrosis hematopoyética infecciosa, anemia infecciosa del salmón y septicemia vírica hemorrágica en salmónidos del Embalse Alicura y su importancia en el comercio.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MORENO

LA BIOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL COMERCIO DE ANIMALES

Tesis de maestría:
Estudio sobre necrosis hematopoyética infecciosa, anemia infecciosa del salmón y septicemia vírica hemorrágica en salmónidos del Embalse Alicura y su importancia en el comercio.

Marcela A. ÁLVAREZ

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE MORENO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MORENO

Rector
Hugo O. ANDRADE

Vicerrector
Manuel L. GÓMEZ

Secretaria Académica
Roxana S. CARELLI

Secretaria de Investigación, Vinculación Tecnológica y Relaciones Internacionales
Adriana M. del H. SÁNCHEZ

Secretaria de Extensión Universitaria
V. Silvio SANTANTONIO a/c

Secretaria de Administración
Graciela C. HAGE

Secretario Legal y Técnico
Guillermo E. CONY

Secretario general
V. Silvio SANTANTONIO

Consejo Superior

Autoridades
Hugo O. ANDRADE
Manuel L. GÓMEZ
Jorge L. ETCHARRÁN
Pablo A. TAVILLA
Roberto C. MARAFIOTI

Consejeros

Claustro docente:
M. Beatriz ARIAS
Adriana A. M. SPERANZA
Cristina V. LIVITSANOS (s)
Adriana M. del H. SANCHEZ (s)

Claustro estudiantil:
Lucia E. FERNANDEZ
Cecilia B. QUIROGA

Claustro no docente:
Carlos F. D'ADDARIO

LA BIOTECNOLOGÍA COMO HERRAMIENTA PARA EL COMERCIO DE ANIMALES

Tesis de maestría:
Estudio sobre necrosis hematopoyética infecciosa, anemia infecciosa del salmón y septicemia vírica hemorrágica en salmónidos del Embalse Alicura y su importancia en el comercio.

Marcela A. ÁLVAREZ

Álvarez, Marcela
La biotecnología como herramienta para el comercio de animales: tesis de maestría : estudio sobre necrosis hematopoyética infecciosa, anemia infecciosa del salmón y septicemia vírica hemorrágica en salmónidos del Embalse Alicura y su importancia en el comercio / Marcela Álvarez. - 1a ed . - Moreno: UNM Editora, 2017.
120 p; 21 x 13 cm. - (Tesis / Sanchez, Adriana)

ISBN 978-987-3700-69-9

1. Biotecnología. I. Título.
CDD 660.6

Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología
Director-Decano: Jorge L. ETCHARRÁN

Colección: Tesis
Directora: Adriana M. del H. SÁNCHEZ

1ª edición: octubre 2017
© UNM Editora, 2017
Av. Bartolomé Mitre 1891, Moreno (B1744OHC),
prov. de Buenos Aires, Argentina
(+54 237) 425-1619/1786,
(+54 237) 460-1309,
(+54 237) 462-8629,
(+54 237) 466-1529/4530/7186,
(+54 237) 488-3147/3151/3473
Interno: 154
unmeditora@unm.edu.ar
http://www.unm.edu.ar/editora

ISBN (edición impresa): 978-987-3700-69-9

La edición en formato digital de esta obra se encuentra disponible en: http://www.unm.edu.ar/repositorio/repositorio.aspx

La reproducción total o parcial de esta obra está autorizada a condición de mencionarla expresamente como fuente, incluyendo el título completo del trabajo correspondiente y el nombre de su autor.

ISBN (edición digital): 978-987-3700-75-0

UNM Editora

Consejo Editorial

Miembros ejecutivos:
V. Silvio SANTANTONIO (presidente)
Roxana S. CARELLI
Adriana M. del H. SÁNCHEZ
Jorge L. ETCHARRÁN
Pablo A. TAVILLA
Roberto C. MARAFIOTI
L. Osvaldo GIRARDIN
Pablo E. COLL
Alejandro A. OTERO
Florencia MEDICI
Adriana A. M. SPERANZA
María de los Ángeles MARTINI

Miembros honorarios:
Hugo O. ANDRADE
Manuel L. GÓMEZ

Departamento de Asuntos Editoriales
Pablo N. PENELA

Staff:
R. Alejo CORDARA (arte)
Josefina Darriba (Ja! Design)
Sebastián D. HERMOSA ACUÑA
Cristina V. LIVITSANOS
Ana C. LOPEZ
Daniela A. RAMOS ESPINOSA

Este libro se terminó de imprimir en noviembre de 2017 en los talleres de El Zocalo Imprenta & Editorial, Río de Janeiro 668 CABA.

Libro de edición argentina
Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723
Prohibida su reproducción total o parcial

L U A Libro Universitario Argentino

editora UNIVERSIDAD NACIONAL DE MORENO

REUN

PRESENTACIÓN

Esta publicación se enmarca en la voluntad de apoyar la producción científica de los integrantes de nuestra comunidad universitaria. En este caso, se trata de un valioso trabajo de la Profesora Adjunta Mg. Marcela ALVAREZ, docente ordinario del Área Biología Celular y Molecular de la Carrera de Licenciatura en Biotecnología de la UNM, la cual inicio sus actividades en el año 2016, en el ámbito del Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la Universidad.

Se trata del resultado de la investigación de su tesis para la Maestría en Salud Animal, realizada por la autora y dirigida por los Dres. Rosana Mattiello y Emilio Leon de la Universidad de Buenos Aires, con el apoyo del entonces Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA); la cual fuera defendida exitosamente en 2015.

El objetivo principal del trabajo fue demostrar que la cuenca alta del rio Limay (Embalse Alicurá) está libre de los agentes etiológicos de necrosis hematopoyética infecciosa (NHI), septicemia hemorrágica viral (SHV) y anemia infecciosa del salmón (AIS); donde se produce el mayor volumen de truchas de Argentina.

Los resultados demostraron que en las condiciones actuales, el riesgo de introducción de estos agentes es insignificante, dada la evaluación de riesgo realizad; concretando un importante aporte a la actividad comercial vinculada a la pesca y demostración del grado de avance y potencia de la biotecnología argentina.

Con esta publicación deseamos alentar a la comunidad de la naciente carrera de Biotecnología de nuestra Universidad a que profundicen esta senda de trabajo y producción científica.

Lic. Adriana M. del H. SÁNCHEZ
Secretaria de Investigación,
Vinculación Tecnológica y Relaciones Internacionales
Universidad Nacional de Moreno

ÍNDICE

Capítulo I.
Presentación de la tesis 11

Capítulo II.
Introducción..... 13
II.1 Importancia de la acuicultura a nivel mundial..... 13
II.2 Producción acuícola nacional..... 16
II.2.1 Producción de trucha arcoíris 17
II.3 Población de peces de la región..... 18
II.4 Impacto de las enfermedades infecciosas en la acuicultura..... 19
II.4.1 Impacto en la producción 19
II.4.2 Impacto en el comercio..... 20
II.5 Antecedentes sanitarios de la región 21
II.6 Descripcion de las enfermedades viricas bajo estudio..... 22
II.6.1 Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI) 23
II.6.1.1 Etiología e inactivación de la NHI..... 23
II.6.1.2 Especies hospedadoras del NHI 24
II.6.1.3 Fases de susceptibilidad del huésped 24
II.6.1.4 Mecanismos de transmisión..... 24
II.6.1.5 Signos clínicos, lesiones y patogenia 25
II.6.1.6 Mortalidad y morbilidad..... 26
II.6.1.7 Control y prevención 26
II.6.2 Septicemia Hemorrágica Viral (SHV)..... 27
II.6.2.1 Etiología e inactivación de la SHV 27
II.6.2.2 Especies susceptibles 28
II.6.2.3 Fases de susceptibilidad del huésped 28
II.6.2.4 Mecanismos de transmisión..... 28
II.6.2.5 Signos clínicos, lesiones y patogenia 28
II.6.2.6 Mortalidad y morbilidad..... 30
II.6.2.7 Control y prevención 31
II.6.3 Anemia Infecciosa del Salmón (AIS) 31
II.6.3.1 Etiología e inactivación de la AIS 31
II.6.3.2 Especies Susceptibles..... 32
II.6.3.3 Fases de susceptibilidad del huésped 33
II.6.3.4 Mecanismos de transmisión..... 33
II.6.3.5 Signos clínicos lesiones y patogenia 33

II.6.3.6 Mortalidad y morbilidad 35
II.6.3.7 Control y Prevención 36
II.7 Zonificación 36
II.8 Evaluacion de riesgo 37

Capítulo III.
Hipótesis 39

Capítulo IV.
Objetivo general y particulares 41
IV1 Objetivo general 41
IV2 Objetivos particulares 41

Capítulo V.
Materiales y métodos 43
V1 Selección de la zona de estudio 44
V2 Diseño del muestreo 46
V3 Captura 51
V4 Necropsia y toma de muestras 52
V.4.1 Toma de muestra para Histopatología 54
V.4.2 Toma de muestra para PCR 55
V5 Técnicas de Diagnóstico 56
V.5.1 Diagnóstico Histopatológico 57
V.5.2 Diagnóstico molecular 58
V.5.2.1 Extracción de ARN de los órganos blancos 58
V.5.2.2 Selección de primers o iniciadores 59
V.5.2.3 Técnicas moleculares aplicadas 60
V.5.2.4 Controles utilizados 62
V.5.2.5 Validación e interpretación de los resultados de PCR 62
V.5.3 Métodos confirmatorios en caso de muestra sospechosa ... 63

Capítulo VI.
Resultados 65

Capítulo VII.
Evaluación de riesgo 73
VII.1 Metodología 74
VII.1.1 Vías de ingreso 75
VII.1.1.1 Alevinos y ovas embrionadas 76

VII.1.1.2 Vía acuática 80
VII.1.1.3 Plantas procesadoras en la zona 86
VII.1.1.4 Transmisión por vía mecánica 88
VII.2 Resultados 91
VII.2.1 Modelo AIS 91
VII.2.2 Modelo SHV 92

Capítulo VIII.
Discusión 93

Capítulo IX.
Conclusiones 99

Capítulo X.
Bibliografía 101

Capítulo XI.
Anexos 113

XI.1 Anexo 1:
Protocolo Extracción de ácido ribonucleico
ARN de tejidos de peces Salmónidos 113

XI.2 Anexo 2:
Protocolo RT-PCR en un paso (one step)
según kit Access RT-PCR System (Promega) 117

XI.3 Anexo 3:
Protocolo PCR convencional según kit Go Taq (Promega) 119

XI.4 Anexo 4:
Electroforesis en geles de agarosa 121

XI.5 Anexo 5:
Controles positivos y negativos 122

XI.6 Anexo 6:
Otras lesiones observadas 123

CAPÍTULO I - PRESENTACIÓN DE LA TESIS

La presente tesis se desarrollo en dos etapas. En la primera se realizó el estudio del terreno y los diagnósticos de laboratorio correspondientes para determinar la ausencia de tres enfermedades víricas que afecta a los salmónidos Necrosis hematopoyética infecciosa, Septicemia hemorrágica viral y Anemia infecciosa del salmón. En la segunda etapa, se realizó una evaluación de riesgo de ingreso de dos de las mismas Septicemia hemorrágica viral y Anemia infecciosa del salmón.

La introducción general pone en contexto el estado actual de la problemática a nivel mundial y nacional de la acuicultura. En el capítulo de materiales y métodos se desarrolla el diseño del muestreo, la metodología para la toma de muestras a campo, acondicionamiento y envío al Laboratorio; y se describen las técnicas diagnósticas empleadas. El capítulo de resultados, se refiere a los datos obtenidos luego de la aplicación de los métodos diagnósticos. El capítulo de evaluación de riesgo contiene la metodología aplicada y los resultados obtenidos del mismo. Finalmente las conclusiones y la discusión que surgen de la integración de las dos etapas.

CAPÍTULO II - INTRODUCCIÓN

II. 1. Importancia de la acuicultura a nivel mundial

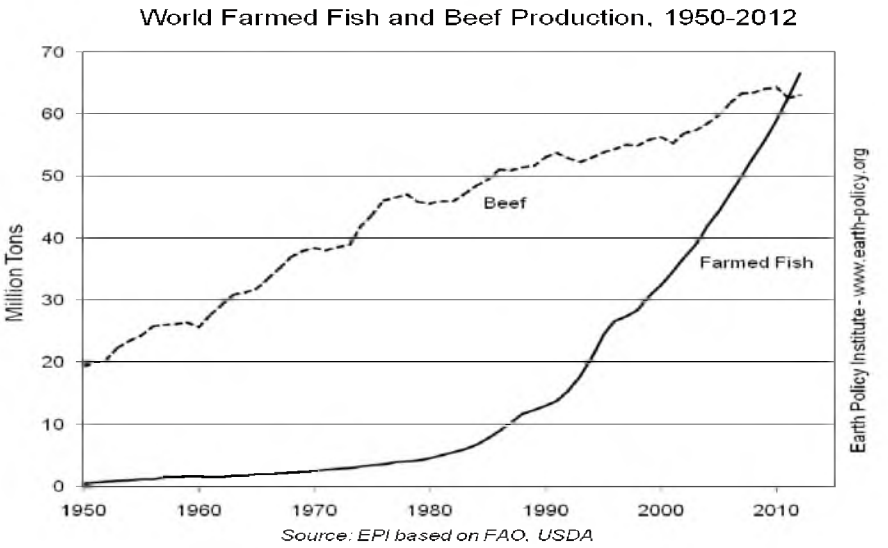
Los alimentos de origen acuícola están dentro de los productos más comercializados del mundo. Tienen su origen tanto en la pesca como en la acuicultura. Durante el año 2012 estas actividades aportaron el 16,7% de proteínas animales a la población mundial. El consumo mundial de pescado per cápita aumentó de un promedio de 9,9 kg en el decenio de 1960 a 19,2 kg en el año 2012. Una parte considerable y cada vez mayor del pescado que se consume en los países desarrollados se abastece de las importaciones, debido a la firme demanda y la disminución de la producción pesquera nacional.

Según las últimas estadísticas disponibles los productos provenientes de la acuicultura han alcanzado a la producción de carne a nivel mundial (Figura 1).

La tasa de crecimiento mundial de la producción por acuicultura fue del 8,3% anual, frente al 2,9% de la producción de carne en sistemas terrestres (Godfray y col. 2010; FAO, 2014).

En las últimas dos décadas, en consonancia con el impresionante aumento de la producción acuícola, se ha producido un incremento considerable en el comercio de numerosos productos de la acuicultura basados tanto en especies de bajo valor como de alto valor. En este sentido, la acuicultura está contribuyendo al aumento del porcentaje que representan los productos pesqueros en el comercio internacional con especies de alto valor como el salmón, el mero, el sargo, el camarón y la gamba, así como con moluscos bivalvos y de otro tipo, pero también con especies de bajo valor como las carpas, los bagres (incluido el pangasius) y la tilapia.

Figura 1:
Evolución de la producción de carnes rojas vs acuicultura (1950-2012)



La producción total de pesca y acuicultura a nivel mundial durante el año 2012 fue de 158 millones de toneladas, sin incluir las plantas acuáticas. Según las últimas estadísticas disponibles recopiladas por la FAO, la producción acuícola mundial alcanzó otro máximo histórico de 90,4 millones de toneladas (equivalente en peso vivo) a 144.400 millones de USD en 2012, de los cuales 66,6 millones de toneladas correspondieron a animales acuáticos comestibles (137.700 millones de USD) y 23,8 millones de toneladas a plantas acuáticas, principalmente algas marinas (6.400 millones de USD).

Así, la producción de la acuicultura generó el 42% de la producción total de pescado mundial en 2012 que, como se señaló, fue del orden de las 158 millones de toneladas producidas tanto por pesca como por acuicultura (Tabla 1)

Tabla 1:
Producción de la pesca y la acuicultura en el mundo (FAO, 2014)

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
PRODUCCION			Millones de toneladas			
Pesca de captura						
Continental	10,1	10,3	10,5	11,3	11,1	11,6
Marítima	80,7	79,9	79,6	77,8	82,6	79,7
Total pesca de captura	**90,8**	**90,1**	**90,1**	**89,1**	**93,7**	**91,3**
Acuicultura						
Continental	29,9	32,4	34,3	36,8	38,7	41,9
Marítima	20	20,5	21,4	22,3	23,3	24,7
Total de acuicultura	49,9	52,9	55,7	59	62	66,6
TOTAL PRODUCCION PESQUERA MUNDIAL	140,7	143,1	145,8	148,1	155,7	158

En cuanto a la distribución geográfica, la acuicultura en los países asiáticos representa más del 88% de la producción mundial, siendo seguidos en orden de importancia por los siguientes continentes América, Europa, África y Oceanía (Tabla 2).

Tabla 2:
Producción por acuicultura por grupo de países

Continente		Año					
		1990	1995	2000	2005	2010	2012
ÁFRICA	ton	81.015	110.292	399.688	646.182	1.286.591	1.485.362
	%	0,62	0,45	1,23	1,46	2,18	2,23
AMERICAS	ton	548.479	919.571	1.423.433	2.176.740	2.581.089	3.187.319
	%	4,19	3,77	4,39	4,91	4,37	4,78
ASIA	ton	10.801.531	21.677.062	28.420.611	39.185.417	52.436.025	58.895.736
	%	82,61	88,9	87,67	88,46	88,82	88,39
EUROPA	ton	1.601.649	1.581.359	2.052.567	2.137.340	2.548.094	2.880.641
	%	12,25	6,49	6,33	4,83	4,32	4,32
OCEANIA	ton	42.005	94.238	121.482	151.466	185.617	184.191
	%	0,32	0,39	0,37	0,34	0,31	0,28

Fuente: FAO 2014

La producción acuícola mundial de especies comestibles aumentó a una tasa media anual del 6,2 % en el período 2000-2012 esto es, de 32,4 millones a 66,6 millones de toneladas. En total se cultivan 230 especies para consumo humano y cerca de 5.400 peces dulceacuícolas y marinas comercializados como ornamentales.

Un 66,6% proviene de la producción de peces con escamas, tanto de aguas continentales como marinas, incluyendo a los salmónidos. Dentro de los peces diádromos, las especies con mayor producción son el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Ambas especies alcanzaron una participación ascendente en el comercio mundial que llegó al 11,5 % de participación en el año 2012, aunque bajó por primera vez ese año debido a las patologías que se produjeron en las poblaciones de cultivo en Chile.

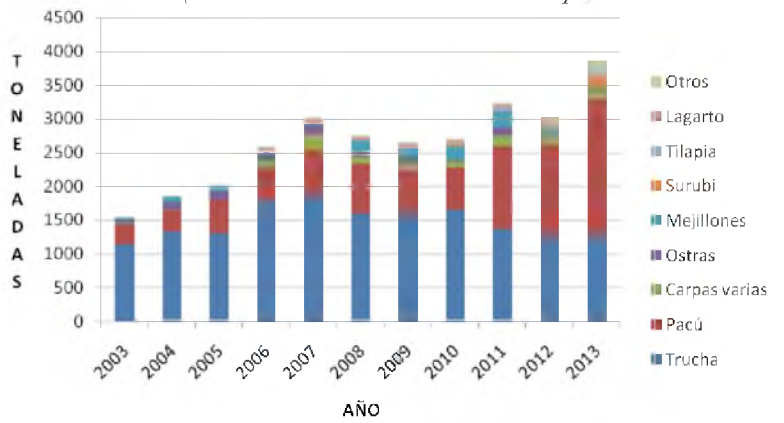
II. 2. Producción acuícola nacional

La producción en Argentina se ha mantenido baja en relación a otros países de la región, oscilando entre las 2.400 Tm y las 2.000 Tm en los últimos 5 años, a pesar que se cuenta con un interesante potencial de sitios y cuerpos de agua marítimos y continentales aptos para su desarrollo.

Se produce un total de 22 especies, tanto autóctonas como el pacú (*Piaractus mesopotamicus*), el surubí (*Pseudoplatystoma* spp) y el mejillón (*Mitylus edulis*) como de especies introducidas como la trucha arcoíris y la ostra cóncava (*Crassostrea gigas*) entre otras. Entre las que se destacan el pacú y la trucha arcoíris con el mayor volumen de producción (Figura 2).

Merece señalarse que los sistemas de cultivo utilizados son distintos: el pacú se produce en condiciones semi-intensivas en estanques en cambio la trucha en sistemas intensivos en jaulas o estanques.

Figura 2:
Producción por acuicultura 2003-2013 en Argentina
(Fuente: Dirección de Acuicultura MAGyP)



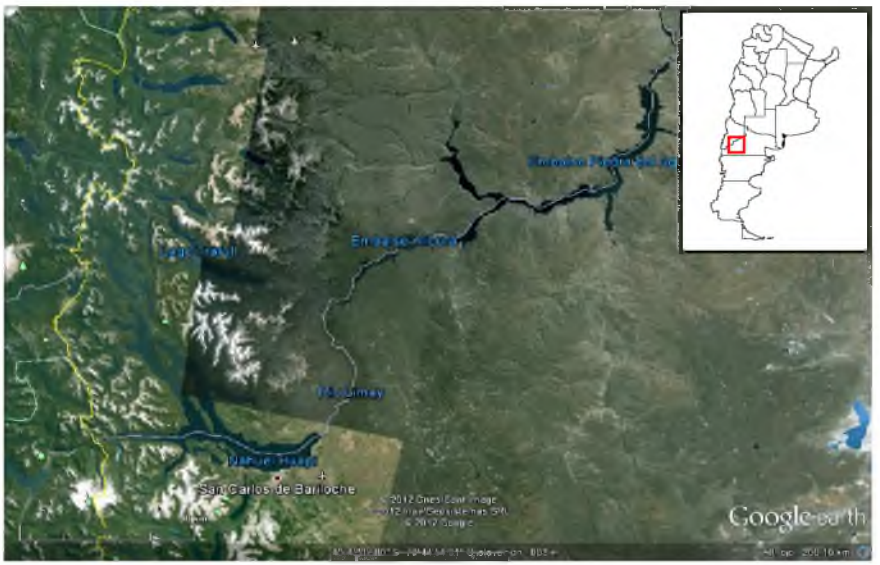
II. 2. 1. Producción de trucha arcoíris

Durante el año 2013 se produjeron en Argentina un total de 1.264 Tm de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), que representó el 32,4% del total de 3.868 Tm de todas las especies que se producen a nivel país. Existen pequeñas producciones artesanales en estanques, pero el sitio de producción industrial se encuentra en el Rio Limay que nace en el Lago Nahuel Huapi de cuenca Atlántica, específicamente en el primer embalse llamado Alicura. Las explotaciones se realizan en jaulas flotantes, en sistemas intensivos, en el cuerpo de agua y hay posibilidades de expansión de la producción a los siguientes embalses: Piedra del Águila, Pichi Picún Leufú y El Chocón. A partir de 1990, se instalaron en el embalse Alicura los primeros emprendimientos para el cultivo intensivo de la trucha arcoíris, debido a las características favorables del ambiente para esta actividad y por las políticas de desarrollo impulsadas por las Provincias y la Nación (Prieto y col., 1996).

El desarrollo de la actividad en este embalse ha generado la introducción de alevinos provenientes de distintos criaderos de la región o bien por importaciones de ovas realizadas en su mayoría de Dinamarca y Estados Unidos. Básicamente éstas introducciones se realizaron para mantener una producción continua de trucha, al introducir alevinos en contra estación y para mejora genética de los planteles de reproductores. En 1996, Wicki & Luchini realizaron una estimación conservadora del potencial de producción basado en el cálculo de la capacidad de carga del embalse, fijando esta última en un tonelaje no inferior a 3.600 Tm/año. Por su parte, Pedrozo y col. (1997) estimaron que para mantener el nivel trófico del embalse cercano a un 80% de su oligotrofia actual, la producción máxima de peces debería situarse entre 3.500 y 5.000 Tm/año.

Los establecimientos se encuentran ubicados en la margen izquierda del embalse, próximo a la ruta nacional N° 237. La Provincia del Neuquén otorgó concesiones en el agua donde se encuentran las jaulas, al igual que la Provincia de Rio Negro, sobre la otra margen con mayor dificultad de acceso.

Figura 3:
Cuenca alta del río Limay



II. 3. Población de peces de la región

En la Patagonia se reconocen dos grandes regiones ictiofaunísticas divididas por el río Chubut: la región del norte o Patagonia Antigua que se extiende a través de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut y la región del sur o región de Santa Cruz que se extiende desde los 45° S hasta el estrecho de Magallanes (Arratia y col., 1983).

La ictiofauna de la región del norte, se caracteriza por poseer baja diversidad y especies endémicas como el *Gymnocharacinus bergi*, carácido que habita la meseta de Somuncurá (Menni & Gómez, 1995), y representantes de las familias Characidae, Trichomycteridae, Callichthydae, (probablemente introducidos, Baigún y col., 2002), Galaxiidae, Anablepidae y Poeciliidae; que comprenden un total de 21 especies (Liotta, 2006).

En el embalse de Alicura, las poblaciones naturales de peces están representadas predominantemente por especies como las percas criollas *Percichthys trucha* y *P. vinciguerrai*, la perca bocona (*P. colhuapiensis*); puyen pequeño (*Galaxias maculatus*), el pejerrey patagónico (*Odontheshis hatcheri*), el bagre otuno (*Diplomystes viedmensis*) y el bagre del torrente (*Hatcheria macraei*) (Pascual y col., 2002).

A partir del año 1900, hubo una fuerte política de introducción de salmónidos provenientes del hemisferio norte en zonas consideradas importantes para la pesca deportiva (Wegrzyn & Ortubay, 2006). Dentro de estas especies, la que mejor se ha adaptado fue la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) junto a otras especies como la trucha marrón (*Salmo trutta*), el salmón encerrado (*Salmo salar*) y la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) (Pascual y col., 2007).

Las provincias, tanto Neuquén como Rio Negro, además del Centro de Salmonicultura de Bariloche que depende de la Universidad Nacional del Comahue (CRUB), poseen estaciones de piscicultura que producen alevinos que proveen a los establecimientos para producción de truchas, como así también para la resiembra de cuerpos de agua básicamente de trucha arcoíris, trucha marrón y salmón del Atlántico variedad encerrado; que son de interés pesquero deportivo.

II. 4. Impacto de las enfermedades infecciosas en la acuicultura

II. 4. 1. Impacto en la producción

El aumento en la producción por acuicultura produce riesgos medioambientales debido a los sistemas de producción intensiva o superintensiva, los que traen aparejados densidades altas, eutrofización de los cuerpos de agua, aparición de diversas patologías, utilización de fármacos y eventual resistencia a los mismos. A medida que la acuicultura se diversifica e intensifica, los riesgos aumentan tanto para los ecosistemas, como para las personas y los propios animales de cría, provocándoles estrés y afectando su inmunidad. Dentro de los riesgos podemos señalar a las enfermedades infecciosas como las que se encuentran bajo estudio, las zoonosis, etc. Las enfermedades tienen un gran impacto negativo en la producción por acuicultura y el desarrollo sostenido de esta actividad. La dispersión de patógenos es provocada por el comercio internacional de animales vivos y sus productos, de piensos y aditivos (Bondad Reantaso, 2004; Subasinghe, 2005; Walker & Winton, 2010).

Las enfermedades infecciosas producidas por bacterias, virus y parásitos, provocan pérdidas directas por bajos rendimientos productivos, mortalidad de animales, crecientes gastos de funcionamiento, cierre de las operaciones de acuicultura con el consiguiente desempleo, restricciones al comercio y los efectos negativos que producen sobre la biodiversidad y el ambiente (Blanco y col., 2000; Mennerat y col., 2010; Winton, 2002 b).

Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan a los peces de cultivo, los virus constituyen el mayor problema en los peces de agua fría, debido a las altas mortalidades que producen y a que no existen tratamientos específicos disponibles, como son los antibióticos en las bacterias. El control y la erradicación de enfermedades víricas en peces, se realiza a través de vacunas en forma preventiva. Sin embargo actualmente, la protección que dan las mismas no es totalmente efectiva debido a las particularidades del sistema inmune de los peces (Fernández Alonso y col., 2001; Winton, 2002 a; Holvold, 2014).

Esto resulta más complejo aún si consideramos que gran parte de los animales que sobreviven a la enfermedad pueden resultar portadores durante largos períodos de tiempo (Winton, 2002 a; Gimenez y col., 2005). Estas circunstancias hacen que las condiciones de manejo y el diagnóstico de los animales enfermos o portadores bien sean de cultivo o silvestres en el caso de producir dentro de una cuenca hídrica en jaulas, constituyan una de las medidas más eficaces en la prevención de estas patologías (Blanco y col. 2000; Winton, 2002 a; Johansen y col., 2011).

II. 4. 2. Impacto en el comercio

En Acuicultura, las pérdidas debidas a las enfermedades infecciosas son mayores que la suma de las pérdidas debidas a todas las demás causas juntas. Se estima que en conjunto un 10% de todos los animales cultivados se pierden cada año debido a las enfermedades (Bondad Reantaso, 2004; Pilay y col., 2005). Muchas enfermedades causan mortalidades superiores al 90% en una granja individual. Solo en Francia la SHV causa pérdidas anuales del 35% de truchas adultas en las áreas infectadas y en USA más del 50% de la cosecha anual, en esta misma especie, se pierde por enfermedades infecciosas. Comúnmente la aparición de una enfermedad viral en una granja requiere el sacrificio de todo el stock y la esterilización completa del establecimiento antes de un nuevo ciclo productivo. La aparición de una infección de éste tipo en cultivo en jaulas en mar abierto puede igualmente ser devastadora. El reciente brote de AIS en el salmón del atlántico en Chile, entre el 2007 y el 2008, representó importantes pérdidas económicas, laborales y cambios fundamentales en las regulaciones de la actividad (Godoy y col., 2008; Mardones y col., 2009). Además los rebrotes de dicha enfermedad ocurridos en Chile, abre la posibilidad de que su agente se torne más virulento (Godoy y col., 2013).

La Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) es la responsable internacional del desarrollo y promoción de estándares sobre Sanidad Animal, que afectan al comercio de animales vivos y sus productos, reconocida por la Organización Mundial del Comercio (OMC). Teniendo en cuenta las características especiales de las poblaciones acuáticas, la OIE creó en 1960 la Comisión para las enfermedades de los peces, para luchar contra el aumento de las mismas, ampliándose en el año 1988 a las enfermedades de los crustáceos y los moluscos.

La comercialización internacional de animales acuáticos tanto vivos como sus productos, demanda el desarrollo de controles sanitarios para responder a los requisitos de los países compradores. La OIE es el organismo que elabora y establece los requerimientos mínimos aplicables al comercio internacional. De acuerdo a ello es necesario conocer el estatus sanitario de una población, dentro de un país, zona o compartimento. Como se desconocía cuál era la situación en el embalse Alicura, se planificó el presente trabajo para el estudio de tres enfermedades que se encuentran dentro de la lista de declaración obligatoria (OIE, Manual Acuático 2014).

II. 5. Antecedentes sanitarios de la región

Hubo diversos estudios realizados desde el año 1990 sobre el estado sanitario de salmónidos en el embalse y la cuenca de Alicura, aunque los mismos fueron esporádicos y realizados por instituciones como el CEAN como autoridad sanitaria por parte de la Provincia de Neuquén o la Universidad del Comahue por trabajos originados en investigaciones y tesis de grado; ninguno había seguido los lineamientos de la OIE (Coria, 1991; Coria y col., 1995; Noguera & Calzolari, 2002)

A partir del año 1994 hasta el año 2002, la Universidad del Comahue a través del Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB) a requerimiento de la Autoridad Jurisdiccional de Cuencas (AIC), realizaron distintos estudios para evaluar el estado ictiosanitario del embalse Alicura que incluyó animales silvestres de distintas especies de salmónidos de la zona del Limay, rio Traful y el propio embalse. Las técnicas empleadas fueron cultivos bacteriológicos y procesamiento por histología, además de IFAT y Elisa. Solamente en las dos campañas llevadas a cabo en el 2002 se detectó la presencia de *Renibacterium salmoninarum*, causal de la enfermedad bacteriana del riñón, en animales silvestres sin signología clínica (Noguera & Calzolari, 2002).

Respecto a los muestreos realizados por el CRUB en trucha arcoíris de cultivo, no se detectó el agente que provoca la enfermedad de la enfermedad bacteriana del riñón.

En el año 1995 el CEAN realizó una serie de campañas de toma de muestras de trucha arcoíris (de cultivo y silvestres), salmón del Atlántico, trucha marrón y trucha de arroyo de origen silvestre. Empleó la técnica de cultivo celular (CHSE-214), para la búsqueda por primera vez en la región de los virus NHI, Necrosis pancreática infecciosa y Herpesvirus en Salmónidos, siendo los resultados NEGATIVOS en el sur de la provincia del Neuquén (Coria y col., 1995).

Las enfermedades detectadas en su mayoría fueron bacterianas (*Flavobacterium* spp, *Aeromona hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc), fungicas (*Saprolegnia* spp) y parasitarias (*Hexamita* spp, *Ichtyophtirus* spp, *Diphillobotrium* spp, etc.) así como también enfermedades nutricionales (Scheinert y col., 1995; Noguera & Calzolari, 2002; Luchini, 2004).

También se enviaron muestras a laboratorios en Chile, por parte de empresas privadas, tomándose muestras de tejido en pooles de a tres, inoculándose líneas celulares de CHSE-214, SHK-1 y BF-2, para el hallazgo entre otras enfermedades virales la AIS, NHI y SHV siendo los resultados NEGATIVOS (com. pers. Rotari).

II. 6. Descripcion de las enfermedades viricas bajo estudio

A continuación se realiza una breve descripción de las enfermedades virales estudiadas en esta tesis: la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI), la Septicemia viral hemorrágica infecciosa (SHV) y la Anemia infecciosa del salmón (AIS).

Las tres enfermedades son de declaración obligatoria para la OIE (OIE, 2014). Las dos primeras se seleccionaron por ser las que más afectan a la trucha arcoíris, provocando importantes mortandades y por los movimientos de importaciones de ovas de países con estas enfermedades. La AIS se seleccionó por ser una enfermedad que ha causado serios problemas en Chile, país que transita por nuestro territorio con alevinos así como con productos terminados y subproductos.

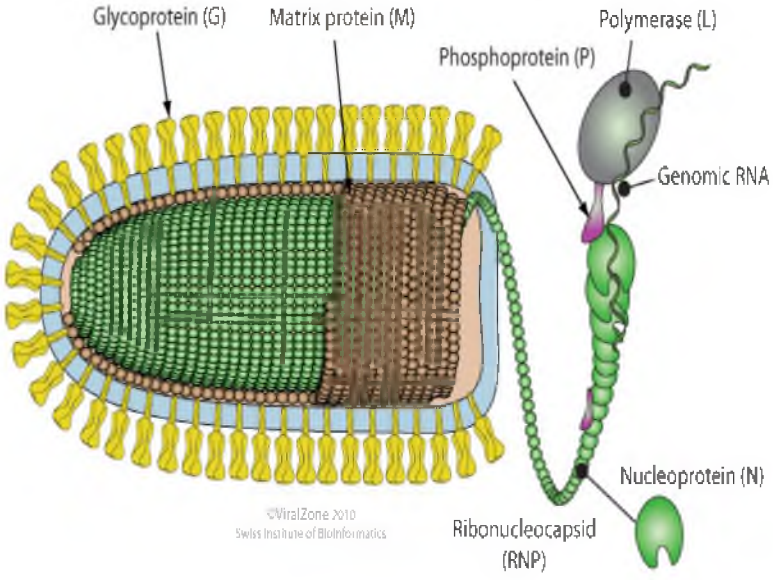
II. 6.1. Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI)

Es una infección cuyas principales consecuencias clínicas y económicas tienen lugar en piscifactorías que crían trucha arco iris, donde los brotes pueden dar lugar a mortalidades muy altas. Sin embargo, también el salmón del Pacífico como el del Atlántico pueden resultar gravemente afectados. El virus de la NHI se ha detectado solo en el hemisferio Norte.

II. 6.1. 1. Etiología e inactivación de la NHI

Es causada por un virus de la familia Rhabdoviridae, género *Novirhabdovirus*, denominado virus de la NHI (VNHI). Tiene un virión que contiene un genoma de ARN mono catenario con polaridad negativa, no segmentado, de aproximadamente 11.000 nucleótidos que codifica para seis proteínas. Los rhabdovirus generalmente tienen cinco polipéptidos (polimerasa L; glicoproteína G; nucleocapside N; fosfoproteína P y matrix M); y una proteína no estructural NV (non virion), que solo se encuentra en los *Novirhabdovirus* (Figura 4). (Emmenegger y col., 2000; Kurath y col., 2003; Enzmann y col., 2005; Enzmann y col., 2010; Nishizawa y col., 2006; Kim y col., 2007; Kolodziejek y col., 2008; Johansson y col., 2009).

Figura 4:
Esquema de virus Novirhabdovirus



Se han registrado variaciones en la virulencia y la preferencia por hospedador en cepas de VNHI durante casos de enfermedades naturales y en infecciones experimentales (La Patra y col., 1993 a; Garver y col., 2006). Este virus, fuera del hospedador, se caracteriza por ser lábil al calor, a la acidez y al éter. El virus sobrevive en agua dulce al menos 1 mes a bajas temperaturas, sobre todo en presencia de materia orgánica. El VNHI se inactiva fácilmente en presencia de los desinfectantes de uso habitual y por desecación y calor a 56° C y pH 3 (Wolf, 1988; OIE Código Acuático 2014).

II. 6.1. 2. Especies hospedadoras

Los principales hospedadores del VNHI son miembros de la familia Salmonidae. Las especies que se ha observado que se infectan de forma natural son: la trucha arco iris (*O. mykiss*), el salmón real (*O. tshawytscha*), el salmón rojo (*O. nerka*), el salmón keta (*O. keta*), el amago (*O. rhodurus*), el salmón japonés (*O. masou*), el salmón plateado (*O. kisutch*) y también el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). En ocasiones se han observado otros salmónidos que presentan susceptibilidad en infecciones naturales (Wolf, 1988; Bootland & Leong, 1999; European Food Safety Authority, 2008;).

II. 6.1. 3. Fases de susceptibilidad del huésped

Las larvas con saco vitelino constituyen el estadio más susceptible. Los adultos suelen ser más resistentes a la enfermedad clínica, pero se ha observado una gran variabilidad al VNHI entre ejemplares.

Un buen estado sanitario de los peces parece disminuir la susceptibilidad al VNHI. La manipulación y otros factores estresantes pueden hacer que infecciones subclínicas lleguen a ser manifiestas.

Los peces se tornan cada vez más resistentes a la infección con la edad hasta el desove; momento en el que, una vez más, se vuelven muy susceptibles y pueden excretar grandes cantidades de virus en los productos sexuales.

Los supervivientes de la NHI presentan una fuerte inmunidad protectora con la síntesis de anticuerpos circulantes contra el virus (La Patra y col., 1993b).

II. 6.1. 4. Mecanismos de transmisión

El virus se excreta por vía urinaria, líquidos sexuales y mucus externo (Bootland & Leong, 1999; Wolf, 1988). La transmisión horizontal es más frecuente en peces juveniles infectados, los que excretan grandes cantidades del virus. También, se han registrado casos de transmisión vertical o asociada a las ovas; ya que es el único mecanismo que explica la aparición de NHI en nuevos

lugares geográficos (Winton, 1991). La transmisión horizontal delVNHI suele tener lugar por exposición directa, pero también se ha propuesto la intervención de vectores invertebrados en la misma (Bootland & Leong, 1999).

Se ha demostrado la existencia de portadores asintomáticos, que representa uno de los mayores riesgos de dispersión de la enfermedad.

II. 6.1. 5. Signos clínicos, lesiones y patogenia

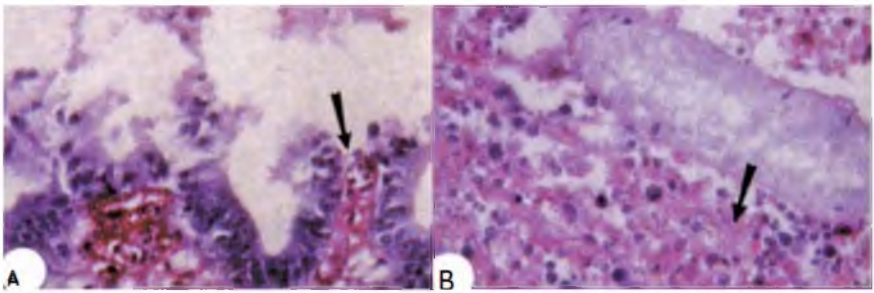
Los signos visibles de la enfermedad son letargia y nado anormal que generalmente preceden a la muerte. En la superficie externa (Figura 5) se observa oscurecimiento de la piel y exoftalmia; branquias pálidas, hemorragias en la base de las aletas y abdomen distendido (Bondad-Reantaso y col., 2001). A la apertura se observa palidez generalizada.

La infección por elVNHI a menudo conlleva mortalidad debida a la perturbación del equilibrio osmótico, lo que trae aparejado edemas y hemorragias. Se cree que el virus ingresa por las branquias y las bases de las aletas, mientras que el riñón, el bazo y otros órganos internos parenquimatosos son los sitios de replicación del virus durante el curso agudo de la enfermedad (Bootland & Leong, 1999; Wolf, 1988).

Figura 5:
A) Exoftalmia y oscurecimiento de la piel B) Branquias bazo e hígado pálidos
(Fuente: CEFAS)

Una alteración histopatológica característica de esta infección, es la presencia de lesiones necróticas en el tejido hematopoyético renal. La enfermedad también provoca necrosis en riñón páncreas y tracto gastrointestinal.

Figura 6:
A: Intestino con células epiteliales negativas y positivas en la lámina propia al VNHI con IHQ (indicado con la flecha). B: Riñón anterior con IHQ positiva en células hematopoyéticas. (H&E x 400) (Fuente: Fish Pathology)



II. 6.1. 6. Mortalidad y morbilidad

En función de la especie de pez, las condiciones de cría, de la temperatura y hasta cierto punto de la cepa vírica, los brotes de NHI pueden oscilar de hiperagudos a crónicos.

Los brotes agudos cursan con un alto porcentaje de mortandad diaria y la mortalidad acumulada puede alcanzar el 90-95% o más (Bootland & Leong, 1999).

En los casos crónicos, las pérdidas por muerte se prolongan y en un mismo lote suelen observarse peces en distintos estadios de la enfermedad.

En pruebas experimentales se ha observado que el VNHI puede producir mortalidad entre los 3°C y los 18 °C (Bootland & Leong, 1999); sin embargo, en condiciones naturales la enfermedad clínica suele tener lugar entre los 8°C y los 15°C.

II. 6.1. 7. Control y prevención

La transmisión es a través del agua, movimiento de animales, contacto con el agua o equipos contaminados no tratados.

Los métodos de control de la NHI, actualmente, se basan en evitar la exposición al virus mediante la implementación de políticas de control estricto y buenas prácticas de higiene (Winton, 1991).

La desinfección profunda de huevos fecundados, la utilización de suministros de agua libre del virus para la incubación y cría, la utilización de instalaciones con medidas de bioseguridad establecidas son fundamentales para prevenir la NHI en cualquier piscifactoría.

II. 6. 2. Septicemia Hemorrágica Viral (SHV)

La SHV es una de las enfermedades más serias de la trucha arco iris de cultivo, debido a la importante mortalidad que provoca que puede llegar al 80% de los individuos de las poblaciones afectadas. Es una enfermedad endémica de muchos países de la Unión Europea (Stone y col., 2008; Duesund y col., 2010).

II. 6. 2. 1. Etiología e inactivación de la SHV

Esta enfermedad es causada por un rabdovirus, que pertenece al género *Novirhabdovirus*, al igual que la NHI. (Figura 4). Es un virus de genoma ARN simple cadena de polaridad negativa, que comprende 11 Kb y que contiene seis regiones codificantes para seis proteínas. La glicoproteína viral G de membrana, es el antígeno de superficie contra el cual se generan los anticuerpos neutralizantes (Walker y col., 2000).

La supervivencia del VSHV fuera del hospedador depende de las condiciones físico-químicas del agua (Ahne, 1982) y de la temperatura; ya que el virus sobrevive durante periodos más largos a 4°C que a 20°C (Parry & Dixon, 1997).

Los VSHV aislados de especies marinas son aparentemente más virulentos que los aislados de especies dulceacuícolas. Se ha documentado que el virus persiste en agua dulce durante 28–35 días a 4°C (Parry & Dixon, 1997) y se ha observado que es infectivo durante 1 año a 4°C en agua dulce filtrada (Hawley & Garver, 2008).

En agua dulce sin tratar a 15°C, el tiempo necesario para una inactivación del 99,9% fue de 13 días, pero en agua marina el virus se inactivó en un plazo de 4 días (Hawley & Garver, 2008). La conservación de peces infectados por el VSHV a temperaturas de congelación comerciales (y la posterior descongelación) no matan completamente al virus, pero reducen su infectividad o título en un 90% o más (Artkush y col., 2006). Los reservorios del VSHV son peces infectados clínicamente así como portadores asintomáticos, que pueden ser peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes.

Existen varios factores que influyen en la susceptibilidad a la SHV En la trucha arcoíris se ha observado una variabilidad genética con respecto a ésta (Henryon y col., 2002a; 2002b), y la edad del pez parece tener cierta importancia (cuanto más joven es el pez es más susceptible). En general, los mayores índices de mortalidad se describieron en peces adultos que nunca antes habían tenido contacto con el VSHV

II. 6. 2. 2. Especies susceptibles

Es probable que el VSHV sea endémico en poblaciones de aguas templadas, en amplias zonas del hemisferio norte. Afecta también al rodaballo y el falso halibut del Japón, así como a una amplia variedad de especies salvajes tanto de agua dulce como marina (European Food Safety Authority, 2008; Meyers & Winton, 1995; Skall y col., 2005). Hasta el momento, se ha aislado el VSHV de unas 80 especies diferentes de peces de todo el hemisferio norte, incluida Norteamérica, Asia y Europa (OIE, 2013)

II. 6. 2. 3. Fases de susceptibilidad del huésped

La infección por el VSHV puede causar enfermedad y mortalidad en todas las fases de vida de los peces susceptibles. La infección puede dar lugar al desarrollo de una inmunidad protectora en zonas endémicas; por tanto, la enfermedad es más abundante en poblaciones de peces jóvenes, previamente no infectados.

II. 6. 2. 4. Mecanismos de transmisión

La transmisión tiene lugar principalmente de forma horizontal por el agua, debido a la excreción del virus con la orina y productos sexuales (Wolf, 1988; Smail y col., 2011).

No se dispone de indicios ni pruebas de una verdadera transmisión vertical del VSHV (Bovo y col., 2005 a; 2005 b). El período de incubación depende de la temperatura y de la dosis infectiva y dura 5 a 12 días a temperaturas óptimas.

La enfermedad tiene lugar a temperaturas de entre 4°C y 14°C. Entre 15°C y 18°C tiene un curso rápido y poca mortalidad acumulada. Las bajas temperaturas del agua (1-5°C) en general dan lugar a un curso largo de la enfermedad, con baja mortalidad diaria pero con una alta mortalidad acumulada. Los brotes de la SHV se pueden dar en cualquier estación del año, pero son más frecuentes en primavera, cuando las temperaturas del agua están aumentando o fluctuando. (Wolf, 1988; Smail y col., 2011).

II. 6. 2. 5. Signos clínicos, lesiones y patogenia

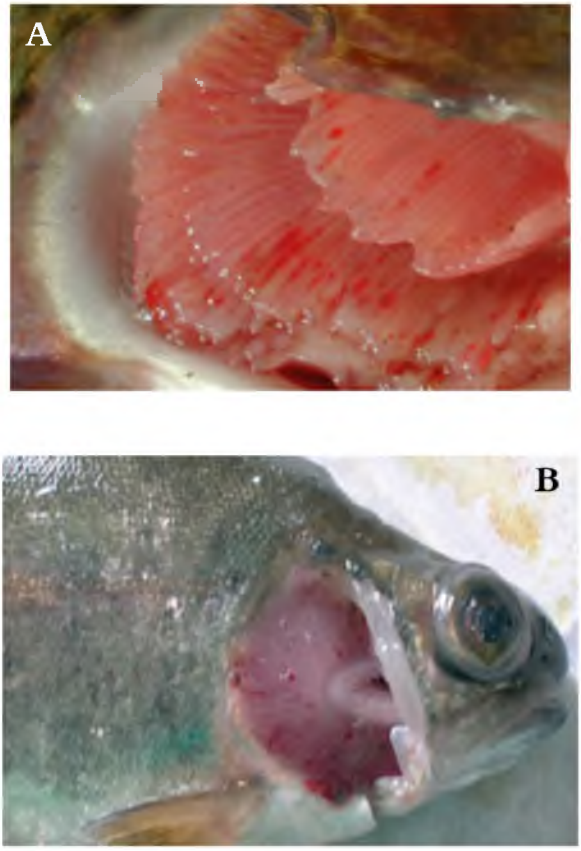
En las fases sépticas de la enfermedad, el virus es abundante en todos los tejidos, incluidos piel y músculos. Los órganos diana son el riñón, el corazón y el bazo, donde el virus es más abundante. En las fases crónicas, los títulos del virus pueden llegar a ser altos en el encéfalo. (Wolf, 1988; Smail y col., 2011).

Los peces enfermos pueden presentar signos clínicos inespecíficos en las primeras fases de la infección, como una aparición rápida de la mortalidad

(que puede alcanzar el 100% de la población de alevinos). La enfermedad presenta tres estadios. En la primera etapa (fase aguda) los signos presentados por los peces son oscurecimiento de la piel, exoftalmia, hemorragias en aletas, piel y ojos. En la segunda etapa, (fase crónica) presentan anemia severa y palidez abdominal con hemorragias internas y necrosis en tejido hematopoyético (Figura 7).

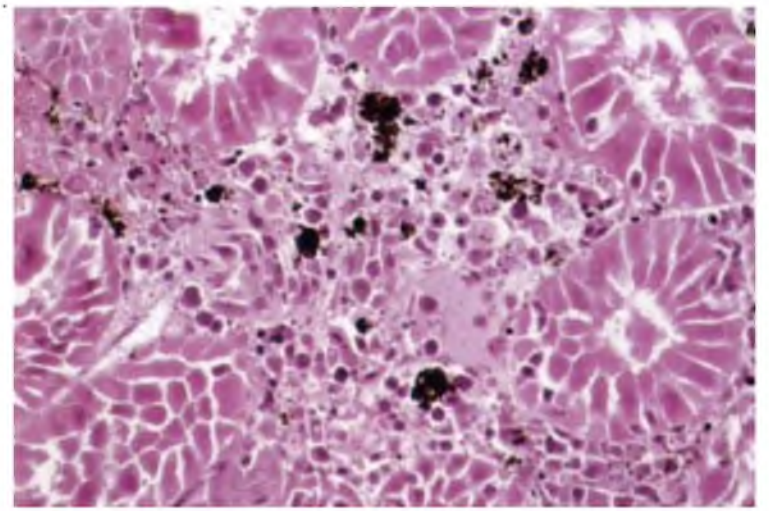
En la tercera etapa debido a alteraciones neurológicas, se produce nado anormal en espiral y desequilibrio osmótico que conlleva a la muerte (Winton y col.; 2002 b)

Figura 7:
A) Hemorragias en laminillas branquiales. B) exoftalmia (Fuente:CEFAS)



Los órganos y tejidos con mayores alteraciones histológicas son el hígado, riñón, bazo y músculo. El riñón exhibe degeneración y necrosis del tejido hematopoyético. El hígado presenta necrosis focales y vacuolización de los hepatocitos.

Figura 8:
Sección de riñón en trucha arcoíris, nótese los melanomacrófagos degranulados, en el tejido hematopoyético H&E x 100 (Fuente: Fish pathology)



II. 6. 2. 6. Mortalidad y morbilidad
La mortalidad varía en función de muchas condiciones ambientales y fisiológicas, la mayoría de las cuales no están del todo determinadas. Esta enfermedad se presenta, en general, en aguas frescas a frías, y la máxima mortalidad tiene lugar entre los 9-12°C.

Los alevinos pequeños de trucha arco iris (0,1-3 g) son más susceptibles al genotipo I a, en los que causa mortalidades cercanas al 100%. Todos los tamaños de la trucha arcoíris son susceptibles, con mortalidades que oscilan entre el 5 % y el 90 %.

Se han notificado brotes de la SHV en ambientes tanto de agua dulce como de agua marina con salinidades de hasta 36 partes por mil y a temperaturas de entre los 2°C y los 20°C. La mayoría de los brotes de la enfermedad se observan en primavera, cuando las temperaturas fluctúan.

En pruebas de laboratorio se ha observado que el intervalo de temperaturas del genotipo IV b del VSHV parece ser el mismo que el del genotipo I, con un óptimo en los 9-12°C y un límite superior en los 18-20°C (Goodwin y col., 2011).

II. 6. 2. 7. Control y prevención

Aún no existe un tratamiento específico de la enfermedad por lo cual es importante el seguimiento continuado y el diagnóstico precoz del virus. Ciertas prácticas de manejo han funcionado para reducir el número de piscifactorías infectadas en una zona endémica y para prevenir la reinfección, como el sacrificio sanitario y el descanso de las instalaciones (Olesen y col., 1997; Olesen, 1998;).

La desinfección de huevos embrionados es una medida preventiva eficiente (Bovo y col., 2005b).

II. 6. 3. Anemia Infecciosa del Salmón (AIS)

Es una enfermedad que afecta tanto a salmónidos silvestres como de cultivo, con presencia en Noruega, Escocia, Estados Unidos, Canadá, Islas Faraoe y Chile. En este último país fue el mayor caso de epidemia registrada en el mundo (Mardones y col., 2009).

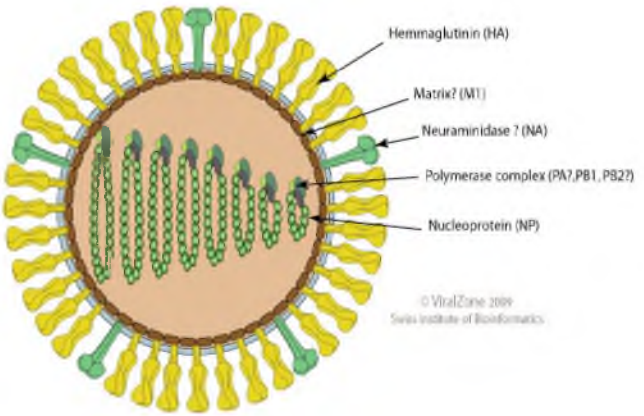
Afecta principalmente al salmón del Atlántico que manifiesta los signos clínicos de la enfermedad y las truchas arcoíris actuarían como reservorios del virus.

II. 6. 3. 1. Etiología e inactivación de la AIS

El virus de la AIS pertenece al género *Isavirus* de la familia *Orthomyxoviridae*. El VAIS, (Figura 9) es un virus envuelto, de 100-130 nm de diámetro, con un genoma formado por ocho segmentos de ARN mono catenario de 1,0 a 2,3 Kb con polaridad negativa (Dannevig y col., 1995).

La cepas de AIS virulentas HPR Δ presentan deleciones en la región altamente polimórfica (HPR) de la glicoproteína de superficie del virion, hemaglutina estearasa. La cepa AIS de baja patogenia HPR0 tiene la secuencia completa de HPR y causa una infección subclínica con replicación principalmente en las branquias sin provocar enfermedad. Se ha sugerido que la cepa con la secuencia HPR entera (HPR0) constituye un precursor a partir del cual se originan todas las variantes patógenas del VAIS con HPR delecionada (patógenas HPR Δ). (Godoy y col., 2013)

Figura 9:
Esquema de un Isavirus



Es difícil realizar una estimación exacta del tiempo que el virus puede permanecer infeccioso en el medio natural, como ser por la presencia de partículas o sustancias que podrían ligarse e inactivar el virus.

El VAIS es sensible a la radiación UV y al ozono. La incubación de un homogenato de tejido procedente de peces enfermos de AIS a pH 4 o pH 12 durante 24 horas inactivó la infectividad del VAIS. La incubación en presencia de cloro (100 mg/ml) durante 15 minutos también inactiva al virus (Rimstad y col., 2011). El VAIS aislado en cultivo celular puede sobrevivir durante semanas a bajas temperaturas, pero la infectividad del virus se pierde en 30 minutos de exposición a 56°C (Falk y col., 1997).

II. 6. 3. 2. Especies Susceptibles

Solo se registraron brotes naturales de AIS en salmón del Atlántico de piscifactoría y en el salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*) solo en Chile, el cual se considera susceptible a la enfermedad (Kibenge y col., 2001; Rolland & Winton, 2003)

En peces de mar, la detección del VAIS mediante RT-PCR se ha notificado en tejidos de carbonero (*Pollachius virens*) y de bacalao (*Gadus morhua*), pero solo en peces obtenidos de jaulas con salmón del Atlántico que presentaran AIS (Mac Lean y col., 2003). Tras la infección experimental mediante baño de inmersión, se ha detectado el VAIS mediante RT-PCR en trucha arcoíris (Biacchesi y col., 2007) y en arenque del Atlántico (*Clupea harengus*). También se ha detectado VAIS en salmón del Atlántico y trucha marina (*S. trutta*) silvestres (Rimstad y col., 2011).

II. 6. 3. 3. Fases de susceptibilidad del huésped

En el salmón del Atlántico los brotes de la enfermedad se observan principalmente en jaulas de agua de mar En el período de agua dulce se han observado solo unos pocos casos (Rimstad y col., 2011), a pesar que la mayor sobrevivencia del virus se presentaría en agua dulce (Tapia y col., 2013).

II. 6. 3. 4. Mecanismos de transmisión:

Es probable que la principal vía de entrada sean las branquias, tanto en el caso del VAIS HPR0 como en caso del VAIS de HPR Δ delecionada, pero no puede excluirse la infección por vía intestinal (oral) o percutánea.

La transmisión activa del virus se ha observado a través de material biológico y no se ha demostrado a través de reproductores (Jones & Groman, 2001; Lyngstad y col., 2011). A pesar que no hay evidencia de verdadera transmisión vertical, según las recomendaciones de la OIE, deberían aplicarse medidas de bioseguridad en huevos y embriones (Vike y col., 2009; Rimstad y col. 2011; Mardones y col., 2014 a).

II. 6. 3. 5. Signos clínicos lesiones y patogenia

En el caso de los peces que han desarrollado AIS resultan infectadas células endoteliales de todos los órganos (branquias, corazón, hígado, riñón, bazo y otros) como se ha comprobado mediante microscopía electrónica, inmunohistoquímica e hibridación in-situ (Aamelfot y col., 2012; Simko y col., 2000).

Las variantes de VAIS con HPR0 parecen afectar principalmente a las branquias, pero esta variante también se ha detectado en riñón y en corazón (Christiansen y col., 2011; Lyngstad y col., 2011).

Los peces afectados presentan branquias pálidas, exoftalmia, hemorragias petequiales en piel y dilatación abdominal. Internamente se observa hepatomegalia con oscurecimiento marcado del parénquima, y hemorragias petequiales en el tejido adiposo.

Los individuos con infección sistémica presentan anemia severa. Se observa también líquido amarillento en las cavidades peritoneales y pericárdicas, edema de la vejiga natatoria, bazo y riñones aumentados de tamaño.

A nivel histológico se observa degeneración y necrosis de los hepatocitos y de las células endoteliales de los sinusoides, donde se pueden observar partículas víricas mediante microscopía electrónica. También en los ventrículos cardíacos se ha podido detectar la presencia de partículas víricas. El tejido renal presentan tinción positiva para el VAIS al utilizar IHQ.

Figura 10

A: Petequias abdominales B: Exoftalmia C: hepatomegalia con oscurecimiento y hemorragias en tejido adiposo (Fuente: Godoy, 2008)

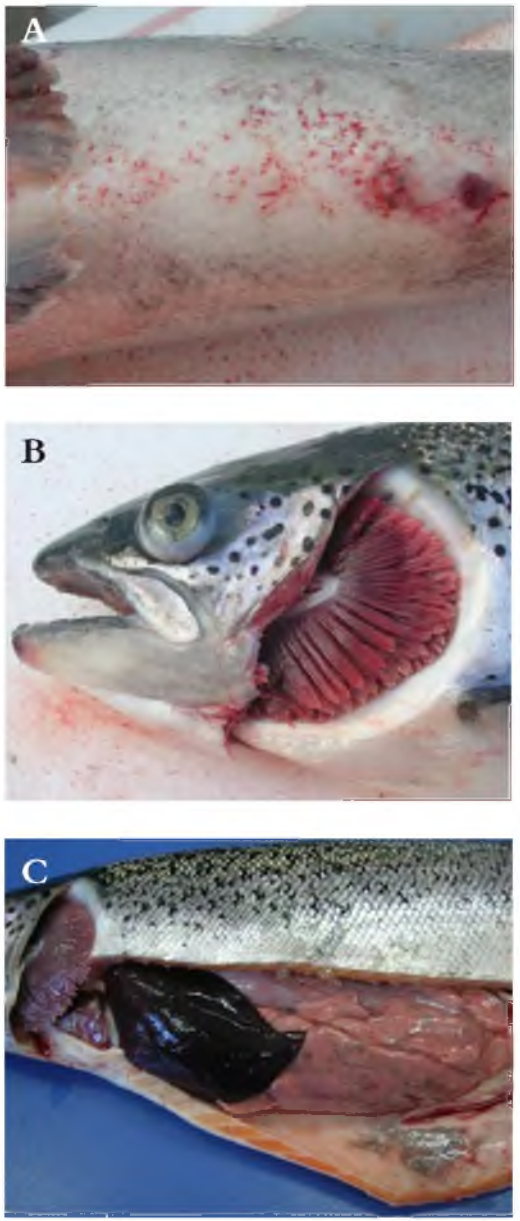
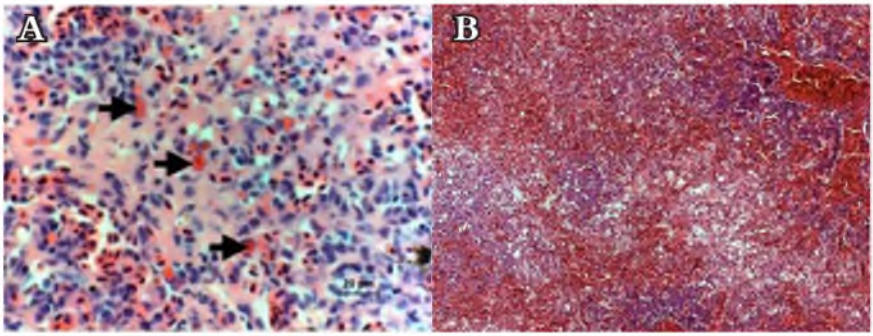


Figura 11

A corte de bazo con eritrofagia endotelial (H&E x 400). B Necrosis hepatocelular, con hemorragia y congestión sinusoidal (H&Ex 100). (Fuente: Godoy, 2008)



II. 6. 3. 6. Mortalidad y morbilidad

Durante los brotes de AIS, la morbilidad y la mortalidad pueden variar en gran medida en una misma jaula y entre distintas jaulas de piscifactorías de agua salada, y entre distintas piscifactorías. Lo habitual es que la mortalidad diaria oscile entre el 0,5% y el 1% en las jaulas afectadas. Sin intervención, la mortalidad aumenta y parece alcanzar el pico a principio del verano y en invierno.

El intervalo de mortalidades acumuladas durante un brote va de insignificante a moderada, pero en los casos graves puede tener lugar una mortalidad acumulada superior al 90% durante varios meses. Inicialmente un brote de AIS puede limitarse a una o dos jaulas a lo largo de un periodo prolongado. En estos casos, si las jaulas con peces con AIS se sacrifican de inmediato, puede prevenirse la aparición de la enfermedad clínica en ese lugar (Mardones y col., 2014 a).

En general, los brotes de AIS tienden a ser estacionales y la mayoría tiene lugar a finales de la primavera y del otoño; sin embargo pueden aparece en cualquier momento del año.

La manipulación de peces (como la clasificación o el tratamiento, el movimiento de jaulas, etc.) puede iniciar brotes de enfermedad en piscifactorías infectadas, sobre todo si con anterioridad ha habido infecciones subclínicas o crónicas no diagnosticadas (Lyngstad y col., 2008)

II. 6. 3. 7. Control y Prevención:
La vacunación contra la AIS se ha llevado a cabo en Norteamérica y en las islas Faroe durante los últimos 5 años. En Noruega la vacunación contra la AIS se llevó a cabo por primera vez en 2009 en una zona con una elevada frecuencia de brotes y Chile empezó la vacunación contra la AIS en 2010. No obstante, las vacunas actuales no parecen ofrecer una protección completa en el salmón del Atlántico. Más recientemente, se ha comprobado que el fármaco antivírico de amplio espectro ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1, 2,4-triazol-3-carboxamida) es eficaz para inhibir la replicación del VAIS tanto in vitro como in vivo (Rivas-Aravena y col., 2011). La desinfección de huevos según los procedimientos estándares se sugiere como importante medida de control, además de medidas de manejo y buenas prácticas relativas al desplazamiento de peces, controles sanitarios obligatorios y reglamentación sobre transporte y sacrificio.

También pueden contribuir a reducir la incidencia de la enfermedad medidas específicas que incluyan restricciones sobre piscifactorías afectadas, sospechosas o próximas, el sacrificio sanitario obligatorio, la segregación generacional ("todo dentro/todo fuera"), así como la desinfección de los desechos y el agua residual de las pesquerías y las plantas de procesamiento de peces (Mardones y col., 2014 a) .

II. 7. Zonificación

Establecer y mantener la ausencia de una enfermedad en un territorio dado es de difícil realización por lo cual es ventajoso establecer una subpoblación de animales acuáticos con estatus sanitario diferente dentro de las fronteras de un país. Estas subpoblaciones pueden ser separadas por barreras naturales o artificiales o por el empleo de métodos adecuados de bioseguridad.

La zonificación es un procedimiento que permite definir un estatus sanitario para el control de enfermedades o para el comercio internacional (Código Acuático OIE, 2014). La zonificación se utiliza cuando los criterios para definir una subpoblación son geográficos.

Según el Código Sanitario para los Animales Acuáticos (OIE, 2014) se define a una zona como una porción de un país o de un conjunto de países que abarca:

1. La totalidad de una cuenca hidrográfica (desde el manantial de un río hasta el estuario o lago).
2. Más de una cuenca hidrográfica.

3. Parte de una cuenca hidrográfica (desde el manantial de un río hasta una barrera que impide la introducción de una enfermedad o enfermedades específicas).
4. Parte de una zona costera bien delimitada geográficamente, o
5. Un estuario bien delimitado geográficamente.

En todos los casos, constituyen un sistema hidrológico homogéneo con un estatus sanitario particular respecto de una enfermedad o enfermedades determinadas. Las zonas deben ser claramente documentadas por las Autoridades competentes (por ejemplo en un mapa o con otros medios de localización precisa, como las coordenadas geográficas).

La zonificación es particularmente relevante en el control de enfermedades de animales acuáticos, ya que éstos no responden con facilidad a las medidas de control de enfermedades utilizadas para el aislamiento y contención en instalaciones de animales terrestres (Subasinghe y col., 2005; Gemmeke y col., 2008).

Para mantener la evidencia de que una zona se encuentra libre de determinadas enfermedades, la autoridad sanitaria de un país, debe

- Monitorear, en forma representativa poblaciones susceptibles a través de los servicios veterinarios, capaces de detectar, investigar y comunicar incidentes de enfermedades.
- Tener acceso a laboratorios capaces de diagnosticar la enfermedad de interés
- Formar especialistas en el estado sanitario de peces, que asegure una detección e identificación de los agentes etiológicos que producen enfermedades.
- Establecer requisitos de importación o traslado, para prevenir la introducción de la enfermedad dentro del país o zona, desde áreas infectadas.

II. 8. Evaluacion de riesgo

El riesgo se define como la probabilidad de ocurrencia de un efecto adverso y la magnitud de sus consecuencias, por ejemplo de la introducción de un patógeno a una zona determinada (Peeler y col., 2007).

El análisis de riesgo tiene el propósito de mejorar los sistemas de control siendo una herramienta útil a fin de definir las medidas que permitirán un mejor estatus sanitario, menores costos de producción y transparencia, a la vez que facilita el acceso a mercados y el comercio nacional e internacional.

El acuerdo de aplicación de las medidas sanitarias y fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio, estimula su aplicación para la investigación del riesgo asociado a la enfermedad en el comercio internacional. En el Código Acuático en su capítulo 2 señala "*que la principal finalidad del análisis del riesgo asociado a las importaciones es proporcionar a los países importadores un método objetivo y justificable para evaluar los riesgos de enfermedad asociados a cualquier importación de animales acuáticos, productos de animales acuáticos, material genético de animales acuáticos, alimentos para animales, productos biológicos y material patológico. Los principios y métodos que se aplican a las mercancías constituidas por animales acuáticos y a las constituidas por animales terrestres son los mismos. El análisis debe ser transparente para poder dar al país exportador una explicación clara y documentada de los motivos que justifican las condiciones impuestas a la importación o el rechazo de ésta" (OIE;* 2014).

El Análisis de riesgo, se divide en cuatro etapas: la identificación del peligro, la evaluación del riesgo, la gestión del riesgo y la comunicación del riesgo.

La evaluación del riesgo puede ser de tipo cualitativa, a través de escalas descriptivas para caracterizar la magnitud del riesgo; o cuantitativa, cuando se asignan valores numéricos y probabilidades a los parámetros del estudio.

La evaluación del riesgo incluye cuatro componentes: la evaluación de la entrada (probabilidad de ingreso del agente), la evaluación a la exposición (probabilidad de que el agente contacte con una especie susceptible), la evaluación de las consecuencias (describe la consecuencias biológicas y económicas que puede tener una exposición determinada y estima la probabilidad de ocurrencia) y la estimación del riesgo (integrando las tres componentes anteriores). (Peeler y col., 2007).

CAPITULO III - HIPÓTESIS

En la cuenca alta del rio Limay no están presentes los agentes etiológicos que producen las enfermedades Anemia infecciosa del salmón (AIS), Necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) y Septicemia hemorrágica viral (SHV) en salmónidos.

CAPÍTULO IV -
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES

IV. I. Objetivo general

- Determinar si los agentes etiológicos que producen las enfermedades virales NHI, SHV y AIS, se encuentran presentes en la población de salmónidos de la cuenca alta del Río Limay.

IV. II. Objetivos particulares

- Contribuir con el SENASA para la definición de una zona libre de estas enfermedades, considerando las características hidrológicas, biológicas y de producción acuícola.
- Diseñar y aplicar un muestreo estadístico que permita detectar con un 95% de confianza considerando una prevalencia del 2%, la presencia de estas enfermedades en peces adultos de cultivo y silvestres.
- Identificar las vías más probables de introducción de dichos agentes.
- Evaluar el riesgo de introducción y dispersión de SHV y AIS en la zona.

CAPÍTULO V - MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el marco de un convenio entre el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MAGyP) representado por la Dirección de Acuicultura de la Subsecretaria de Pesca y Acuicultura y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). De dicho convenio se obtuvieron los fondos para la compra de insumos de laboratorios y gastos de campañas.

Parte del trabajo realizado en la presente tesis fue coordinar las tareas, como representante del MAGyP, y participar en forma activa durante las campañas de recolección de muestras. Para la obtención de los ejemplares silvestres, la tarea fue programada con las autoridades de las Provincias de Río Negro y Neuquén, esta última a través del Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), y la Autoridad Interjurisdiccional de Cuenca (AIC). Las campañas para la recolección de los animales de cultivo, la realización de las necropsias y acondicionamiento de muestras se ejecutaron en forma conjunta con personal del SENASA, del MAGyP y el CEAN.

El procesamiento de las muestras para histopatología y PCR se realizó en los Departamentos de Patología y de Biología Molecular del Laboratorio Central del SENASA (DILAB), en la localidad de Martínez, Provincia de Buenos Aires

El MAGyP junto con asesores contratados, el Dr. Luis Romano y el Lic. Fernando Raibenberg, colaboraron en el presente estudio para el diagnóstico histopatológico de las enfermedades y la puesta a punto de las técnicas de biología molecular.

V. 1. Selección de la zona de estudio

Para el presente trabajo se seleccionó la cuenca alta del rio Limay desde su origen, el Lago Nahuel Huapi, su efluente el río Limay y su afluente el río Traful; hasta la represa de Alicura.

La producción de salmónidos por cultivo abarca más de 15 concesiones otorgadas, de las cuales 8 se encuentran en producción con un volumen total estimado superior a 1.200 Tm (Figura 12) (Demichelli y col. 2013; D. A., 2013).

Como se mencionó anteriormente tanto este embalse como los que están en la cuenca media tienen importantes posibilidades de aumento de producción. Por otra parte una característica de estas producciones desde el punto de vista sanitario es el tránsito de alevinos provenientes de otras zonas y de importaciones.

Figura 12
Embalse Alicura jaulas en producción

El lago Nahuel Huapi es de origen glacial y presenta una morfología sumamente ramificada en siete brazos; origina como único emisario al río Limay de cuenca Atlántica. Este río marca el límite entre las provincias de Neuquén y Río Negro. El río Limay próximo a su nacimiento en el paraje Rincón Chico, recibe desde el oeste al arroyo Newbery, al arroyo Chacabuco y por la margen derecha al arroyo La Fragua. En la zona denominada "el Anfiteatro" lo alcanza el arroyo del Corral. El río describe luego una curva hacia el este hasta la zona conocida como "Bajada de Mena", sitio en el que desemboca el arroyo Carbón por la margen izquierda y el arroyo Chacay por la derecha. El río Limay luego continúa hasta el lugar llamado "Confluencia" donde desemboca el río Traful, el cual nace de los aportes que origina el río Pichi Leufú en la cordillera. A la salida del lago, el río Traful recibe los aportes de los ríos Mineros, Cuyin Manzano, Arroyo Blanco y Córdoba. (Álvarez, 2004).

Al construirse represas en varios tramos, quedaron constituidos una serie de embalses con determinadas características según sus tiempos de maduración, prácticas de manejo y uso.

La construcción de estos embalses apunta a la producción de energía hidroeléctrica y la regulación de los caudales. El primer embalse es Alicura, seguido de Piedra del Águila, Pichi Picún Leufú, El Chocón (Ezequiel Ramos Mexía) y Arroyito (Dique compensador).

El embalse Alicura posee una superficie de 67,5 km^2, y una profundidad media de 48,4 m.

Su coronamiento se localiza en plena meseta patagónica, mientras que la zona correspondiente a la llamada "cola de embalse" se encuentra situada en pleno ecotono entre la estepa y el bosque Andino-Patagónico.

El clima de la zona es de carácter semiárido, con precipitaciones medias anuales que alcanzan los 500 mm. Las temperaturas en enero muestran un promedio de 18° C mientras que en julio oscilan cercanas a los 4° C. Por sus características limnológicas es considerado un lago oligotrófico (Dirección de Recursos Hídricos, 1995).

V. 2. Diseño del muestreo

El diseño del muestreo se basó en las recomendaciones de la OIE (OIE Código Acuático, 2006).

El objetivo fue detectar con un 95% de confianza al menos un individuo infectado, si la prevalencia fuese igual o mayor a 2%.

Dado que al momento de realizarse los muestreos, no se disponía de datos acerca de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas diagnósticas utilizadas, se asumió que las pruebas no generaban errores (sensibilidad = especificidad = 1).

El tamaño de muestra se calculó en base a la siguiente fórmula:

n= tamaño de muestra

$$n=\left[1-(1-NC)\frac{1}{d}\right]x\left(N-\frac{d-1}{2}\right)$$

NC= nivel de confianza (0,95)

d= número de enfermos detectables en la población. Surge de multiplicar el tamaño de la población (N) por la prevalencia detectable, que a su vez es el resultado del producto entre la prevalencia esperable (p) y la sensibilidad (Se) del método diagnóstico (N x p x Se)

Otro supuesto considerado fue que todos los individuos del embalse, tanto silvestres como de cultivo, tuvieron la misma probabilidad de estar infectados dado que compartían el mismo medio acuático.

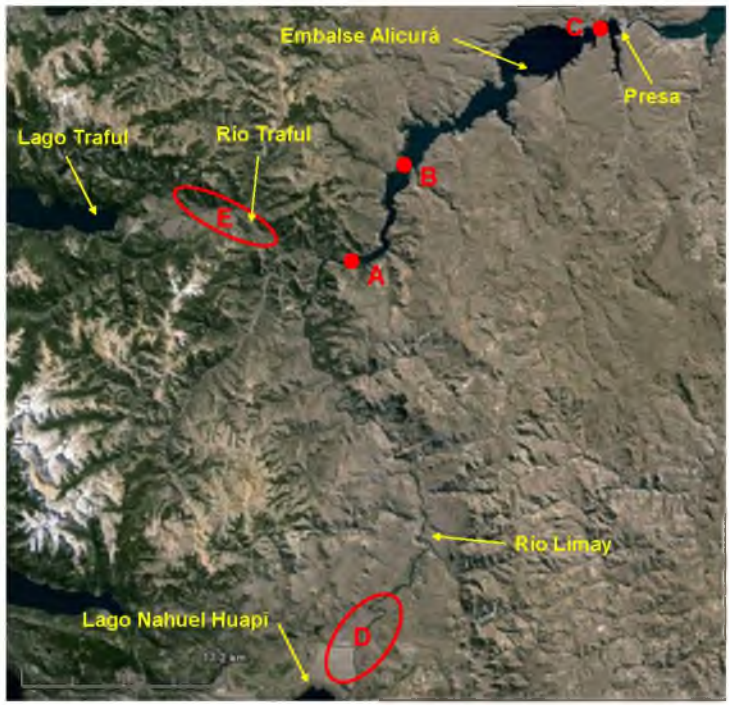
Parámetros y supuestos utilizados: NC: 0,95, N: infinito, p: 0,02, Se: 1.

En base a los valores indicados el tamaño de muestra obtenido fue de 148.

Este diseño se aplicó durante dos años, con cuatro campañas anuales (8 muestreos en total). En cada campaña se tomaron muestras de animales silvestres y de animales de cultivo.

Figura 13

Zona de estudio y sitios de captura de animales silvestres



Con respecto a los animales silvestres se capturaron solo individuos susceptibles a los agentes estudiados, pertenecientes a la familia Salmonidae: *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoíris TAI), *Salmo trutta* (Trucha marron TM) *y Salmo salar* (salmon encerrado Ss) a partir de cinco puntos de captura localizados tres dentro del embalse Alicura y dos en los ríos afluentes a saber (Figura 13):

a. En el ingreso del Embalse.
b. Malal Huaca, en el centro del embalse (mayor cantidad de jaulas).
c. Las Coloradas próximo a la presa.

d. Río Limay, próximo a su nacimiento.
e. Río Traful como el afluente más importante de la cuenca; donde se realiza la resiembra de peces y pesca deportiva destacada especialmente del salmón del Atlántico.

Las muestras de los animales de cultivo, se tomaron de los ocho establecimientos de engorde de la zona bajo estudio. Estos establecimientos presentaban un rango de producción anual de entre 30 a 350 Tm y están ubicados sobre la costa oeste del embalse, a lo largo de 4 km (Figura 14).

Figura 14
Ubicación de los establecimientos productores de truchas en el Embalse Alicura

Se realizaron ocho campañas de muestreo entre octubre de 2006 y octubre de 2008, tomándose la cantidad de muestras descriptas en la Tabla 3.

Tabla 3
Número de muestras tomadas por muestreo y origen

Muestreo	Estación	Peces de cultivo	Peces silvestres	Total
1	Verano	82	91	173
2	Otoño	86	65	151
3	Invierno	87	66	153
4	Primavera	83	70	153
5	Verano	75	75	150
6	Otoño	83	68	151
7	Invierno	80	79	159
8	Primavera	84	75	159
	Total	660	589	1249

Por otra parte se controlaron los establecimientos proveedores de alevinos a la zona, tanto de origen nacional como importados. En 2007 se muestrearon 3 establecimientos ubicados dentro de la zona, 3 fuera de la misma y 2 establecimientos importadores de ovas. En 2008 se muestrearon 2 establecimientos ubicados dentro de la zona, 7 fuera de la misma y 2 importadores de ovas.

Los muestreos se realizaron una vez al año, tomándose 60 muestras de individuos por establecimiento (30 para histopatología y 30 para PCR), más 2 muestreos de introducción de ovas de importación provenientes de Dinamarca y Estados Unidos. En la Tabla 4 se presentan más detalles.

Tabla 4

Muestreo de Alevinos y ovas

Código del Establecimiento	Ubicación del Establecimiento	Fecha de Muestra	Motivo	Tipo de Muestra
				muestra
		Año 2007		
A	Extra zona Importación	12/10/2007	Importación	Alevinos TAI
B	Intra zona	28/09/2007	Tránsito	Alevinos TAI
Código del Establecimiento	Ubicación del Establecimiento	Fecha de Muestra	Motivo	Tipo de Muestra
				muestra
		Año 2007		
G	Extra zona	23/09/2007	Tránsito	Alevinos TAI
A	Extra zona Importación	23/05/2007	Importación	Alevinos TAI
		Año 2008		
H	Extra zona	29/12/2008	Tránsito	Alevinos TAI
I	Extra zona	01/11/2008	Tránsito	Alevinos TAI
B	Intra zona	01/11/2008	Tránsito	Alevinos TAI
F	Extra zona	01/11/2008	Tránsito	Alevinos TAI
G	Extra zona	01/11/2008	Tránsito	Alevinos TAI
E	Intra zona	30/10/2008	Tránsito	Alevinos TAI
C	Extra zona	19/10/2008	Tránsito	Alevinos TAI
J	Extra zona	25/09/2008	Tránsito	Alevinos TAI
A	Extra zona Importación	19/06/2008	Importación	Ovas TAI
K	Extra zona Importación	20/02/2008	Tránsito	Alevinos TAI
A	Extra zona Importación	18/01/2008	Importación	Ovas Ss.

TAI (Trucha arco iris)

Ss (Salmo salar)

V. 3. Captura

La captura de los animales silvestres adultos se realizó utilizando artes de pesca activas (spining y flycast) y artes pasivas (redes de enmalle). Estas últimas se revisaron a intervalos de 2 hs. a fin de que los animales fuesen capturados vivos y así disminuir al mínimo el tiempo de permanencia en la red. En las capturas, se trabajó en forma conjunta con la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas y con la provincia de Rio Negro y Neuquén.

Los animales capturados fueron colocados en recipientes con agua o jaulas para su posterior retiro. Todos aquellos peces que no fueron objetos de estudio fueron liberados inmediatamente (Figura 15).

Figura 15
Captura y traslado de animales silvestres y de cultivo

La recolección de especímenes de los establecimientos de cultivo, se realizó empleando un copo. Dentro de la cohorte próxima a cosecha se extrajeron

primero animales moribundos y se completó el tamaño muestral con animales seleccionados al azar de las distintas jaulas.

Por otra parte, se recolectaron de los distintos criaderos alevinos de no más de tres centímetros (Figura 17 b).

Todos los muestreos se realizaron en forma conjunta entre el CEAN, el SENASA y la Dirección de Acuicultura.

V. 4. Necropsia y toma de muestras

Los animales adultos muestreados se transportaron vivos en contenedores apropiados al lugar de necropsia, donde fueron sacrificados con anestesia a dosis letal en un baño de benzocaína a razón de 60 mg/l.

Se identificó la especie por características externas y se tomaron medidas de largo total (LT, largo desde la punta del hocico hasta el lóbulo más largo de la aleta caudal), largo estándar (LS, largo desde la punta del hocico hasta el límite posterior de la ultima vértebra), sexo y peso de cada uno de los ejemplares, registrándose los datos en las planillas correspondientes.

Para la necropsia se posicionó al pez de cúbito lateral en una bandeja, con el lado izquierdo hacia arriba. Se cortó la aleta pectoral y se efectuó un corte transversal en un punto inmediatamente anterior al ano. El segundo corte se realizó partiendo desde el punto donde se hizo la incisión inicial hacia arriba en forma semicircular, para cortar la pared dorsal de la musculatura que cubre la cavidad abdominal, hasta el opérculo. Luego se efectuó otro corte, que abarcó desde el opérculo hasta el istmo donde terminó el primer corte, dejando expuestas las vísceras; a continuación se cortó el opérculo dejando al descubierto las branquias (Figura 16).

Se procedió a retirar el hígado, bazo, corazón, páncreas, riñón anterior y posterior; registrándose todas las observaciones en planillas.

Figura 16
Pasos de necropsias y toma de muestra

Para el muestreo de alevinos se siguió el mismo procedimiento de anestesia que para los animales adultos, pero colocándolos enteros en sus correspondientes frascos con fijadores.

V. 4. 1. Toma de muestra para Histopatología

Figura 17
A) Criadero de alevinos B) toma de muestra.

Ejemplares adultos: se colocaron los trozos de órganos conservados en formol al 20% en solución tampón; en una proporción de 15-20: 1. Se utilizaron recipientes plásticos de 250 ml, de boca ancha y cierre hermético, se acondicionaron los frascos en cajas, cerradas y rotuladas adecuadamente para su envío al laboratorio. Las muestras procedentes de un mismo animal o necropsia se colocaron en un mismo frasco, excepto que hubieran requerido una individualización especial.

Alevinos: se recolectaron ejemplares no mayores a tres centímetros, los cuales fueron colocados en frascos con formol al 20% (Figura 17).

V. 4. 2. Toma de muestra para PCR

Ejemplares adultos: se recolectaron muestras de bazo, hígado, riñón craneal y corazón, bajo medidas de asepsia e instrumental estéril (limpieza con alcohol y flameado) necesarias para minimizar las contaminaciones. Los trozos de órganos fueron introducidos en crio viales (1 por cada órgano) debidamente rotulados y luego colocados en varillas metálicas (1 por animal), para su acondicionamiento en termos con Nitrógeno líquido (Figura 18). Una vez en el laboratorio, las muestras fueron almacenadas en un freezer de –70°C hasta el momento de realizar el análisis de PCR. Los alevinos fueron colocados en frascos con etanol al 96% para su procesamiento por biología molecular (Figura 17 b).

V. 5. Técnicas de Diagnóstico

Los criterios utilizados para seleccionar los métodos de diagnóstico fueron disponibilidad, factibilidad del procesamiento, costo y calidad (sensibilidad y especificidad). En base a estos criterios se utilizaron las técnicas de histopatología y la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La totalidad de las muestras de animales adultos fueron procesadas por histopatología.

Por PCR se procesaron veinte individuos (tres órganos por cada uno) por campaña.

Todos los animales que presentaron algún tipo de lesión histológica, fueron incluidos para su análisis por PCR, completándose con individuos sin lesiones. Los animales fueron tomados al azar incluyendo en igual proporción peces silvestres y de cultivo.

Figura 18
A) Toma de muestras, B) conservación para PCR

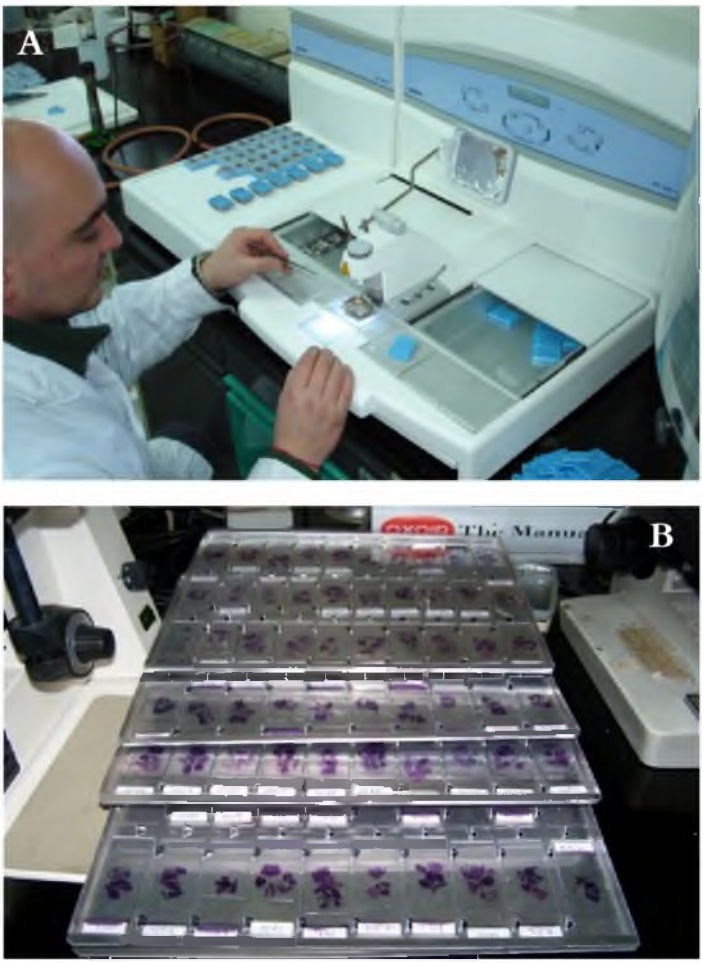
V. 5. 1. Diagnóstico Histopatológico

Las muestras fueron separadas del fijador, cortadas en trozos de 0,3 0,5 cm y colocadas en canastillas plásticas (casetes), una por cada individuo; identificadas con el número de pez. Todas las muestras se procesaron en un Procesador Automático de Tejidos marca Slee Mainz modelo MTP y se incluyeron en paraplast.

Los tacos con las muestras se cortaron a un grosor de 3 µm en un micrótomo rotatorio Reichert Jung modelo Supercat 2050. Los alevinos se procesaron enteros y se cortaron en sentido longitudinal a un grosor de 5 µm.

Los cortes fueron coloreados con Hematoxilina de Mayer y Eosina, y fueron examinados con un microscopio de luz transmitida (Figura 19). El diagnóstico se registró en planillas confeccionadas al efecto. Las microfotografías se obtuvieron mediante un microscopio Olimpus B201 con un sistema PM20.

Figura 19
A) inclusión de tejido en paraplast, B) cortes coloreados



V. 5. 2. Diagnóstico molecular

V. 5. 2. 1. Extracción de ARN de los órganos blancos

En cada muestreo se procedió a la extracción de ARN total de los órganos blanco muestreados (bazo, riñón craneal y corazón) de la siguiente manera:

Se procesaron 60 extracciones de ARN de los 3 órganos procedentes de los 20 especímenes previamente estudiados por histología con el agregado de un 10% de controles negativos (2 extracciones de bazo y 2 de riñón

anterior de animales libres de patógenos certificados). Por su parte, los alevinos se procesaron enteros en pooles de a 5 individuos.

Para la extracción de ARN en las determinaciones de ISA, IHN, y VHS, se procedió de acuerdo al protocolo de purificación de ARN total de tejidos animales usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), o SV Total RNA Isolation System (Promega), según las recomendaciones del manual de diagnóstico de organismos acuáticos de la OIE 2006 (Anexo I).

Las extracciones de ARN total se controlaron para determinar la pureza e integridad del mismo, con el objetivo de verificar si era amplificable, además de detectar otras posibles inhibiciones que pudiesen alterar las reacciones diagnósticas posteriores.

Cada extracción de ARN fue verificada mediante una reacción de RT-PCR (transcripción reversa-PCR) con primers sintetizados a partir de la secuencia de ARN mensajero del gen β Actina de *Salmo salar:* β Actina forward 5′-CAG CCC TCC TTC CTC GGT AT-3 y β Actina reverse 5′-GAT GTC CAC GTC ACA CTT CAT GAT-3 cuyo amplicón es de 80 bp. (Wargelius y col., 2005).

V. 5. 2.2. Selección de primers o iniciadores

Los primers o iniciadores utilizados en todas las enfermedades monitoreadas se seleccionaron de las secuencias publicadas en el manual de diagnóstico de organismos acuáticos de la OIE 2006.

Enfermedades virales analizadas mediante RT-PCR:

1.- Necrosis hematopoyética infecciosa, *Infectious haematopoietic necrosis* (IHN)

En la detección del virus de la NHI se utilizó la técnica de RT-PCR en un paso (one step) en un primer round y una PCR convencional con primers internos para el segundo round. Ambos primers son específicos de la nucleoproteína de VNHI y conservados para la mayoría de los aislamientos del virus (Winton y col. 2002 a).

El par de primers del primer round son: forward 5'-TCAAGG-GGG-GAG-TCC-TCG-A-3' y reverse 5'-CAC-CGT-ACT-TTG-CTG-CTA-C-3'; que generan un producto de amplificación de 786 bp.

Los primers del segundo round de amplificación son: forward 5'-TTC-GCA-GAT-CCC-AAC-AAC-AA-3' y reverse 5'-GCG-CAC-AGT-GCC-TTG-GCT-3'; cuyo producto de amplificación es de 323 bp. (Winton y col. 2002 a).

Como primers confirmatorios complementarios se utilizó el set IHN3 & IHN4 (Williams y col. 1999).

2.- Septicemia hemorrágica viral, *Viral haemorrhagic septicaemia* (VHS)

Para identificar específicamente el virus de la SVH se utilizó un juego de primers conservados para la nucleoproteínas de VHSV forward 5'-GGG-GAC-CCC-AGA-CTG-T-3' y reverse 5'-TCT-CTG-TCA-CCT-TGA-TCC-3' y el amplicón de 811 bp. (Winton y col., 2002 a; Marshall y col., 1998).

Primers confirmatorios complementarios:VHS3 &VHS4 según (Williams y col., 1999; Marsh y col., 2002).

3.- Anemia infecciosa del salmón (AIS) *Infectous salmon anemia ISA*

En el caso de la detección del Virus de la AIS son varios los sets de primers recomendados por la OIE; en éste diagnóstico se seleccionó el juego de primers ILA1 forward 5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C3' & ILA 2 5'- GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3' que amplifican una región del segmento 8 del virus generando un amplicón de 155 bp (Mjaaland y col., 2002) y como primers confirmatorios un set de primers diseñados por el laboratorio de referencia de OIE: Seg 6U forward 5'GGA-ATC-TAC-AAG-GTC-TGC-ATT-G-3' & Seg 6L reverse 5'CTT-CAA-AGG-TGT-CTG-ACA-CGT-A-3' que amplifican una región del segmento 6, cuyo producto de amplificación es de 130 bp. También fue utilizado un tercer set de primers confirmatorios complementarios para el segmento 8; ISAV FA-3F 5' GAA-GAG-TCA-GGA-TGC-CAA-GAC-G-3' ISAV RA-3R 5' GAA-GTC-GAT-GAA-CTG-CAG-CGA-3' (Devold y col., 2000).

V. 5. 2.3. Técnicas moleculares aplicadas

En la aplicación de los métodos moleculares se siguieron las recomendaciones sugeridas por los protocolos establecidos por la OIE (Manual del Código Acuático 2006) con las siguientes modificaciones:

- Reacción de Nested RT-PCR en un paso se utilizó el esquema general del protocolo del kit Access one step RT-PCR System, Promega Corp (Anexo 2) y PCR convencional según protocolo Go Taq Promega Corp (Anexo 3), detección de VNHI, se procedió:

  1er round de Nested RT-PCR en un paso: Se preparó en frío la mastermix fraccionando 25 µl de la misma en cada tubo de reacción sin el templado. Cada volumen de reacción final contiene: agua bidestilada

estéril libre de nucleasas, buffer de reacción RT-AMV/Tfl 1 X, 0.25 mM de cada dNTPs, 1 mM de MgSO4, 0.2 µM de cada primer, 10 U de RNAseout, 0.1 U/µl de RT AMV y 0.1 U/µl de Tfl ADN polimerasa termo estable. En un área diferente se agregó el templado de RNA extraído y tratado con DNAsa, a cada tubo conteniendo la mix, en frío. El perfil de amplificación para 35 ciclos de PCR de 3 pasos más un paso de RT es el siguiente: RT 45°C durante 45 minutos, desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, annealing 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto, extensión final a 72°C por 7 minutos, más un paso de mantenimiento a 15°C.

Segundo round de PCR: Se preparó en frío la mastermix fraccionando 25 µl de la misma en cada tubo de reacción sin el templado. Cada volumen de reacción final contiene: agua bidestilada estéril libre de nucleasas, buffer de reacción GoTaq 1 X, (Promega) 0.25 mM de cada dNTPs, 0.2 µM de cada primer específico y 1.25 U de Taq ADN polimerasa termoestable.

En un área diferente, en frío, se agregó el producto de la reacción de RT-PCR del 1er round 1 µl a cada tubo conteniendo la mix. Se aplicó el siguiente perfil de amplificación de 30 ciclos de PCR de 3 pasos: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, desnaturalización ciclo a 94°C por 30 segundos, annealing 50°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto, finalmente un paso de espera a 15°C .

- Reacción de RT-PCR en un paso, para la detección de VSVH, VAIS; procediéndose de la siguiente forma:

  Reacción de RT-PCR (VSHV): Se preparó en frío la mastermix fraccionando 25 µl de la misma en cada tubo de reacción sin el templado. Cada volumen de reacción final contiene agua bidestilada estéril libre de nucleasas, buffer de reacción AMV/Tfl 1 X, 0.25 mM de cada dNTPs, 1 mM de MgSO4, 0.2 µM de cada primer, 10 U de RNAseout, 0.1 U de AMV y 0.1 U Tfl polimerasa.

  En un área diferente se agregó el templado de ARN extraído a cada tubo conteniendo la mix en frío. Se programó el ciclador térmico para 35 ciclos de PCR de 3 pasos más un paso de RT transcripción reversa: 45°C por 45 minutos, desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, desnaturalización ciclo a 94°C por 30 segundos, annealing 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto, extensión final a 72°C por 7 minutos, finalmente un paso de espera a 15°C.

Reacción de RT-PCR VAIS: Se preparó en frío la mastermix fraccionando 25 µl de la misma en cada tubo de reacción sin el templado. Cada volumen de reacción final contiene: agua bidestilada estéril libre de nucleasas, buffer de reacción AMV/Tfl 1 X, 0.25 mM de cada dNTPs, 1 mM de MgSO4, 0.2 µM de cada primer, 10 U de RNAseout, 0.1 U/µl de AMV y 0.1 U/µl Tfl polimerasa. Se fraccionó la mastermix en cada tubo de reacción sin el templado. En un área diferente se agregó el templado de RNA extraído y tratado con DNAsa, a cada tubo conteniendo la mix en frío. Se programó el ciclador térmico para 35 ciclos de PCR de 3 pasos más un paso de RT transcripción reversa 45°C por 45 minutos, desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, desnaturalización ciclo a 94°C por 30 segundos, annealing 62°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto, extensión final a 72°C por 7 minutos. Finalmente un paso de espera a 15°C.

Análisis de los productos de amplificación: Los productos de amplificación de cada determinación de PCR y RT-PCR se analizaron en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio. Posteriormente el gel es transiluminado con luz ultravioleta para visualizar las bandas de amplificación específicas (Anexo 4)

V. 5. 2.4. Controles utilizados

Controles positivos: Los controles positivos para las determinaciones de PCR de las enfermedades que se estudiaron, fueron solicitados por DILAB SENASA a los centros de referencia internacionales OIE, publicados en el manual de diagnóstico de organismos acuáticos OIE 2006 (Anexo 5). Todos los controles obtenidos fueron conservados a -80°C.

Controles negativos**:** Los controles negativos se obtuvieron de peces SPF libres de patógenos certificados, (Anexo 5) de las especies *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch,* utilizando la misma metodología anteriormente descripta para la toma de muestras de los individuos a estudiar. Los órganos de los peces SPF extraídos se conservaron a -80°C.

V. 5. 2.5. Validación e interpretación de los resultados de PCR

No se deben observar bandas específicas en los controles negativos de SPF ni en el blanco de reacción. Por otra parte deben detectarse las bandas específicas correspondientes a los controles positivos de la reacción. Si se cumplen todas estas condiciones se considera que el ensayo se ha efectuado correctamente. La detección de una banda correspondiente al producto de

la amplificación del agente etiológico estudiado, cumpliendo con los criterios anteriormente mencionados, son confirmatorios de la presencia de las secuencias especificas del mismo y se considera el resultado como POSITIVO. La falta de detección de estas bandas específicas en un ensayo efectuado correctamente es considerada como NEGATIVO.

V. 5. 3. Métodos confirmatorios en caso de muestra sospechosa

Según la metodología implementada en el Laboratorio a través de los Programas Operativos Estandarizados, se considera que en el supuesto caso de obtener muestras con lesiones compatibles con algunas de las enfermedades, se confirmaban del siguiente modo:

- Histopatología: La confirmación se realizaría mediante Inmunohistoquímica y/o Microscopia electrónica y se enviaba para su procesamiento por PCR- RT-PCR.
- PCR, RT-PCR positivos: Los mismos se reconfirmarían a través de la detección por repetición a partir de la misma muestra y nueva extracción de la muestra del tejido original en conservación. Analizándose los casos, con primers confirmatorios accesorios que cubran una región diferente del genoma viral que los primers de screening. En todos los casos en los que se corrobore la detección de una banda correspondiente a la secuencia específica del patógeno en estudio, se confirmaría identidad por secuenciación molecular y análisis de las secuencias obtenidas a través de métodos bioinformáticos (alineación de secuencias). Solamente si se cumplen estos criterios de validación se consideraría un resultado positivo confirmado, evitando de esta manera los resultados falsos positivos.

CAPÍTULO VI - RESULTADOS

Un total de 1249 especímenes de tres especies: trucha arcoíris, trucha marrón y salmón del Atlántico, tanto de cultivos como silvestres fueron capturados en una proporción de 46,6% de machos y 53,3% hembras (Tabla 5).

Tabla 5

Detalle de animales muestreados por especie y sexo en cada campaña

Muestreo	N Total	Macho	Hembra	Tai	TM	Ss
1	173	83	90	173	0	0
2	151	81	70	142	9	0
3	153	82	71	140	12	1
4	153	64	89	149	4	0
5	150	84	66	145	5	0
6	151	56	95	144	5	2
7	159	71	88	149	6	4
8	159	62	97	155	4	0
Total	**1249**	**583**	**666**	**1197**	**45**	**7**

Referencias: Tai: trucha arco iris TM: Trucha marrón Ss: Salmon salar

Los valores promedio de los animales muestreados fueron: peso: 502,5 gr; largo total: 33,5 cm; largo estándar: 30,5 cm. En la Tabla 6 se presentan estos datos, discriminados por muestreo.

Podemos considerar que las tallas para especies de cultivo fueron similares ya que se eligieron las cohortes próximas a cosecha, y en el caso de los animales silvestres fue variable tal como se ve en los muestreos 3 y 4 donde se capturaron truchas marrones de mayor porte (> 2.500 kg).

Tabla 6

Detalle del Peso promedio, Largo total y Largo estándar

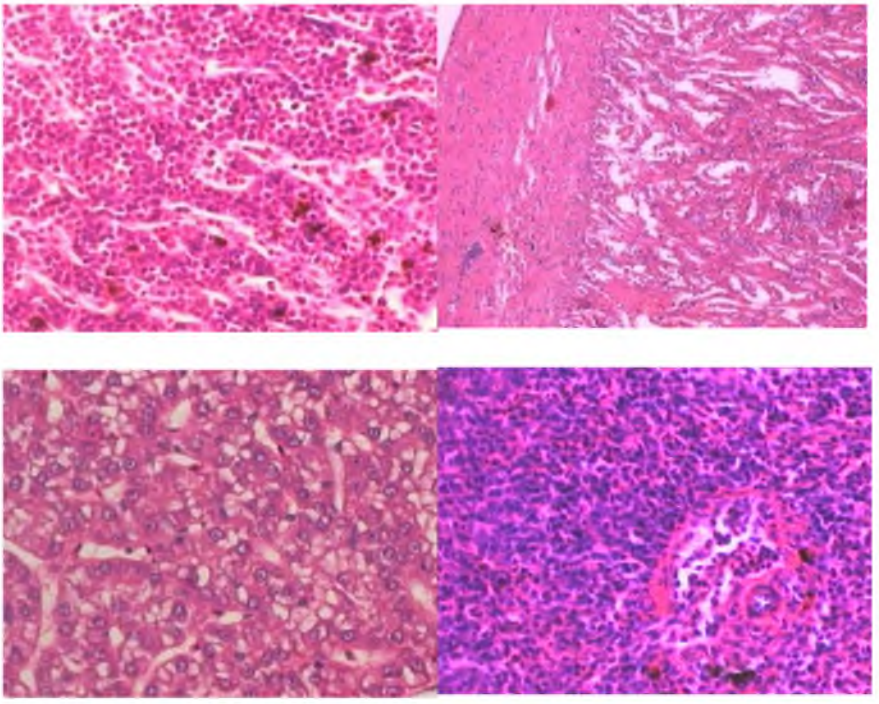
Muestreo	Peso (gr)	Largo total (cm)	Largo Estándar (cm)
1	460,04	33,00	30,29
2	448,87	33,09	30,07
3	661,66	32,59	31,52
4	610,01	35,18	31,52
5	468,53	33,53	30,49
6	476,04	33,22	30,00
7	479,81	34,14	30,27
8	415,6	33,52	29,64
Promedios	**502,57**	**33,53**	**30,48**

En ningún caso se observaron signos o lesiones macroscópicas compatibles con alguna de las enfermedades bajo estudio. Tampoco se registraron mortandades anormales que pudieran indicar una enfermedad viral en poblaciones silvestres o de cultivo.

Los estudios histopatológicos realizados en muestras de bazo, hígado, corazón y riñón no identificaron lesiones compatibles o patognomónicas de las enfermedades NHI, SVH o AIS. En la Figura 20 se aprecian cortes histológicos normales de los órganos estudiados.

Figura 20:

Cortes histológicos de salmónidos muestreados. Presencia de tejidos normales: (A) Riñón anterior, (B) Corazón, (C) Hígado (D) Bazo. Coloración de H&E x 400 (Fuente: DILAB)



Otras lesiones encontradas de ejemplares adultos muestreados se especifican en el Anexo 6.

Los análisis sobre los alevinos para el ingreso al embalse, por histopatología, sobre un total de 510 animales, durante los años 2007 al 2008, no detectaron ninguna lesión compatible con las enfermedades bajo estudio.

Los resultados de las 1092 muestras analizadas por la técnica RT-PCR, se presenta en la Tabla 7, identificándose los órganos por enfermedad y fecha de campaña (para las muestras de octubre 2006 y marzo 2007, no se tomaron muestras de corazón para AIS)

Tabla 7
Detalle de las pruebas diagnósticas por RT-PCR sobre los virus ARN estudiados

Agente etiológico	Virus NHI		Virus SVH		Virus AIS		
Órgano blanco	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	Corazón
Fechas Muestreo							
oct-06	20	20	20	20	20	20	
mar-07	22	22	22	22	22	22	
jun-07	20	20	20	20	20	20	20
sep-07	20	20	20	20	20	20	20
dic-07	20	20	20	20	20	20	20
mar-08	20	20	20	20	20	20	20
jul-08	20	20	20	20	20	20	20
oct-08	20	20	20	20	20	20	20
N° eterminaciones	**162**	**162**	**162**	**162**	**162**	**162**	**120**

No se han detectado las secuencias específicas de los virus de NHI, SVH y AIS en las muestras analizadas (Tabla 8).

Tabla 8
Resultados del procesamiento por RT-PCR

Fechas Muestreo	Nº de muestras analizadas	Resultados NHI	Nº de muestras analizadas	Resultados SHV	Nº de muestras analizadas	Resultados AIS
oct-06	40	Negativo	40	Negativo	40	Negativo
mar-07	44	Negativo	44	Negativo	44	Negativo
jun-07	40	Negativo	40	Negativo	60	Negativo
sept-07	40	Negativo	40	Negativo	60	Negativo
dic-07	40	Negativo	40	Negativo	60	Negativo
mar-08	40	Negativo	40	Negativo	60	Negativo
jul-08	40	Negativo	40	Negativo	60	Negativo
oct-08	40	Negativo	40	Negativo	60	Negativo

A continuación se muestran, a modo de ejemplo, resultados de las distintas amplificaciones efectuadas para las tres enfermedades bajo estudio, además de los controles negativos y controles positivos correspondientes (Figura 21, Figura 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25 y Figura 26).

Figura 21

Control de amplificación de ARN con primers sintetizados a partir de la secuencia del ARN mensajero del gen de B actina del Salmo salar.

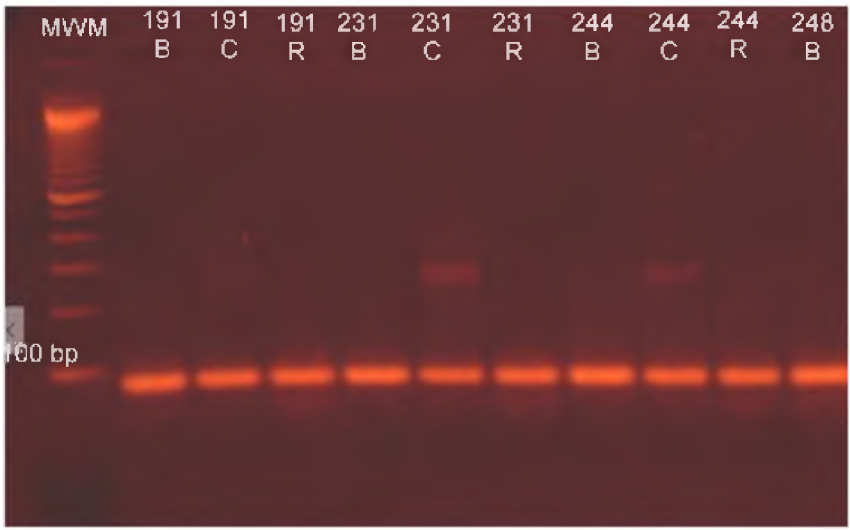


Figura 22

Resultado de la amplificación por RT-PCR one step VNHI para la núcleo proteína de NHI, 1 round, en gel de agarosa 2 % TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 5R a 81 R muestras de riñón craneal, control Negativo, Blanco y Control positivo (virus de cultivo VNHI) 786 bp.

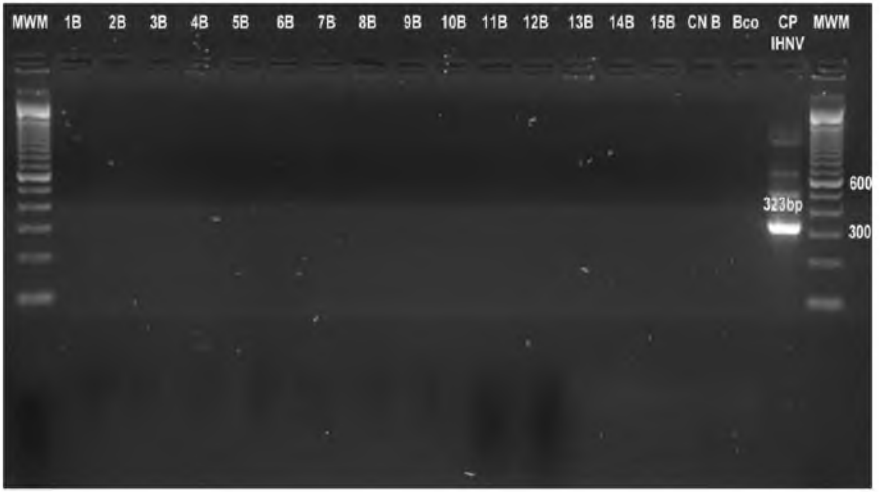


Figura 23

Resultado de la amplificación por PCR 2° round VNHI para la núcleoproteína de NHI, en gel de agarosa 2 % TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 1B a 15 B muestras de bazo, control Negativo, Blanco y Control positivo (NHI) 323 bp

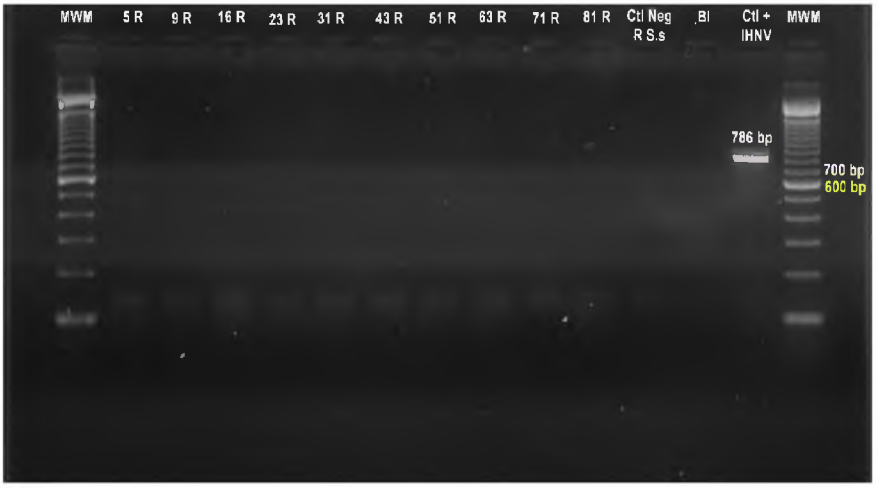


Figura 24

Resultado de la amplificación por RT-PCR one step VSVH para la nucleoproteínas de SVH, en gel de agarosa 2 %TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 5B a 81 B muestras de bazo, control Negativo, Blanco y Control positivo (SVH) 811 bp

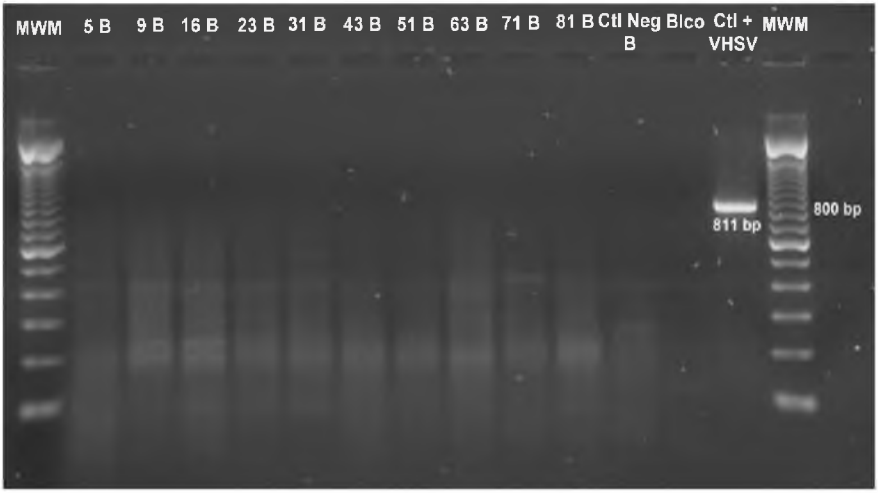


Figura 25

Resultado de la amplificación por RT-PCR one step ISAV para el segmento 8 ILA 1/2, en gel de agarosa 2 %TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 1C a 15 C muestras de corazón, control Negativo, Blanco y Control Positivo (AIS) 155 pb.

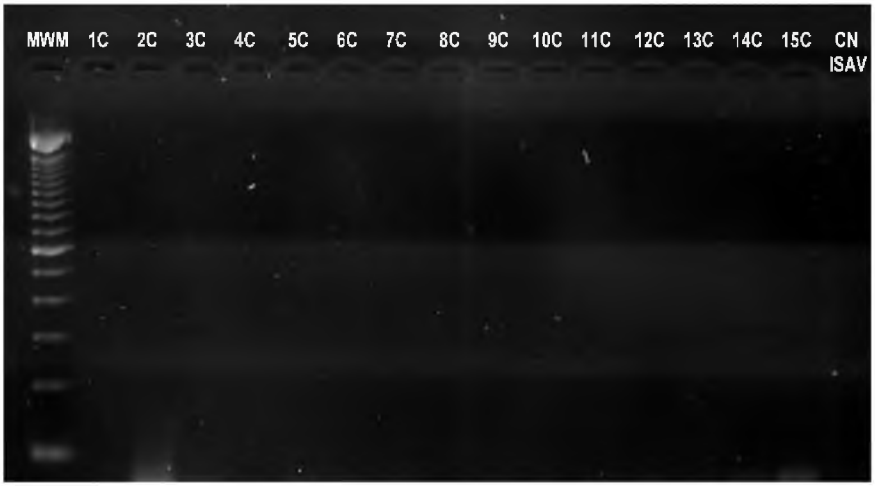
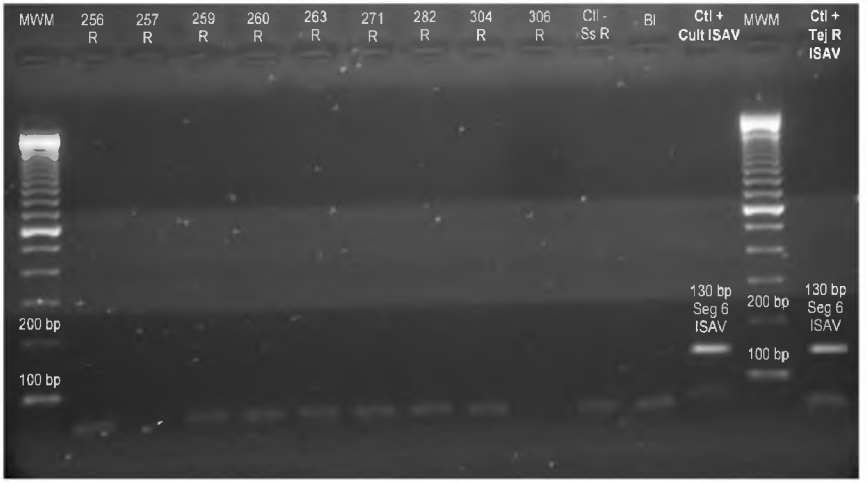


Figura 26

RT-PCR one step ISAV para el segmento 6, en gel de agorosa al 2% TBE 1x MWM 100 pb (Promega) Calle 256R a 306R muestras de riñón, control Negativo, blanco, control positivo.



CAPÍTULO VII - EVALUACIÓN DE RIESGO

Luego de la realización del presente estudio, el SENASA declaró una zona libre de siete enfermedades (OIE, 2010), las cuales incluyen las tratadas en esta tesis, a partir de agosto del 2013 a través de la Resolución 375 (Figura 27).

Figura 27
Zonificación del área declarada libre.

Al demostrarse que la zona está libre de estas enfermedades, cobra importancia la identificación de las potenciales vías de ingreso de los agentes, así como la evaluación del riesgo asociado con cada una de ellas. A tal fin se realizó una evaluación de riesgo de introducción del virus de AIS y del virus de SHV. Se seleccionaron estas enfermedades por las siguientes razones:

- AIS: la enfermedad fue detectada en Chile en 2007, y desde entonces está presente en el país. El virus es infectivo en condiciones naturales para salmón del Atlántico (se encuentran en la cuenca del Limay animales silvestres *Salmo salar*, se demostró la presencia de HPR0 en trucha arcoíris silvestre y se comprobó infección experimental en la misma especie (Rimstad y col, 2011). Parte de la producción chilena de salmón es trasladada a los mercados de consumo a través de la zona libre de Argentina.
- SHV: si bien esta enfermedad no ha sido aún detectada en el hemisferio sur, se encontraba presente en algunos de los países desde los que anteriormente se importaban ovas. Produce importantes mortandades en trucha.

VII.1 Metodología

Se realizó un modelo de riesgo para cada enfermedad, ambos exactamente iguales y con los parámetros ajustados de acuerdo a la enfermedad simulada. O sea, la simulación de cada enferemedad se realizó de manera independiente.

La evaluación de riesgo fue de tipo cuantitativo, iterativo y estocástico. Se utilizó el programa @Risk, versión 5.5, de Palisade Corporation.

Las vías de ingreso analizadas fueron: 1- alevinos y ovas embrionadas, 2- acuática, 3- plantas procesadoras y 4- transmisión mecánica. Cada vía está constituida por un número variable de vías secundarias, para cada una de las cuales se construyó un árbol de eventos. Para cada evento se estimó de manera independiente la probabilidad de ocurrencia.

La probabilidad total de cada vía secundaria (PTvs) se calculó de la siguiente manera: primero se multiplicaron las probabilidades de cada evento, obteniéndose la probabilidad de ocurrencia asociada al ingreso a la zona de riesgo de una unidad bajo estudio (Pi). Luego, a dicha probabilidad se le incorporó el efecto relacionado con el número de unidades ingresadas en un año. Esto se realizó mediante la siguiente ecuación: $PTvs = 1 - (1 - Pi)^n$, donde n es el número de unidades ingresadas a la zona en un año.

La probabilidad de cada vía de ingreso (PTV) se obtuvo sumando el riesgo de cada vía secundaria (PTv) que la compone, a lo cual se le restó la probabilidad conjunta de todas las vías secundarias: PTV1 = (PTvs1 + PTvs2 + … + PTvsn) - (PTvs1 × PTvs2 × … × PTvsn).

La probabilidad final (PF) es la suma de las PTV: PF = PTV1 + PTV2 + PTV3 + PTV4.

El modelo fue ejecutado en 1000 iteraciones estocásticas. A los parámetros se les adjudicó una distribución de Pert, con valores mínimos, más probables y máximos. La definición de estos valores representó la mayor dificultad para la elaboración del modelo, dada la gran incertidumbre asociada con los datos.

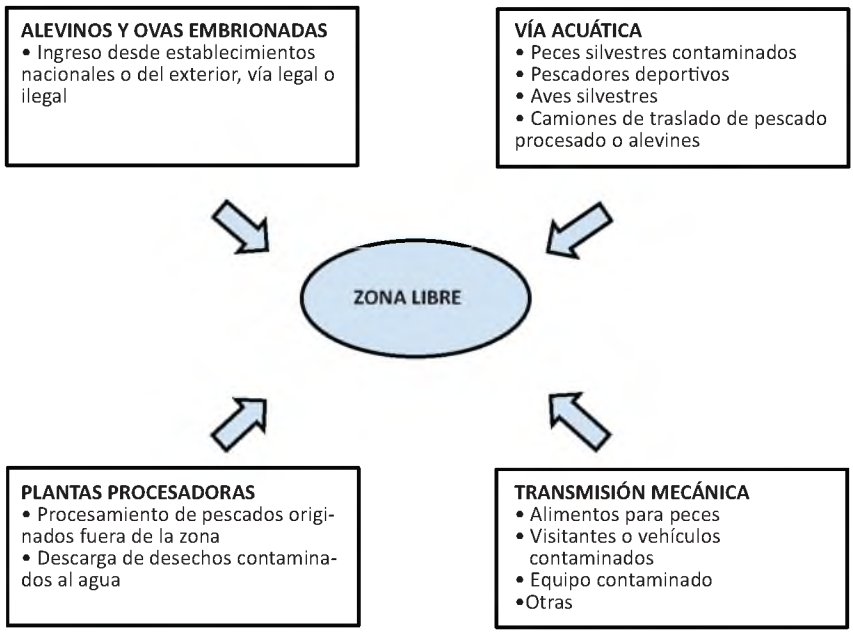
Para determinar los valores de algunos parámetros se recurrió a la bibliografía. En otros se recabaron datos a partir del SENASA, de organismos locales y de los productores de la zona. Pero lamentablemente, muchos de los parámetros incluidos en el modelo presentaron una gran incertidumbre, lo cual se manejó ampliando sus valores mínimos y máximos

VII. 1. 1. Vías de Ingreso

En la Figura 28 se presentan las potenciales vías de ingreso identificadas para ambos agentes.

Figura 28

Vías de ingreso de patógenos a zona libre



VII. 1. 1. 1. Alevinos y ovas embrionadas

En la actualidad no existen productores de alevinos en el embalse Alicura; son adquiridos a distintos criaderos tanto de la zona libre como extra zona (nacional o por importación). Hasta el año 2010 se realizaron importaciones al país de ovas de trucha arcoíris, provenientes básicamente de Dinamarca y Estados Unidos destinadas al engorde en el Embalse Alicura, y en una oportunidad se importó salmón del Atlántico con intenciones de cultivo en el embalse, pero no se autorizó su ingreso a la zona. En la Tabla 9 se presentan los datos de importaciones recientes, suministrados por el MAGyP y el SENASA. También se realizan importaciones de alevinos desde Chile para la elaboración de vacunas, pero no son ingresados a la zona.

Tabla 9
Importaciones de salmónidos a la Argentina

Años	Especie	Estadío	Procedencia	**Cantidad**
2010	Trucha arcoíris	ovas	Dinamarca	2.000
2009	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	700.000
	Trucha arcoíris	ovas	Dinamarca	735.000
2008	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	700.000
	Salmo salar	ovas	EEUU	100.000
2007	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	500.000
	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	150.000
	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	1.000.000
	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	700.000
2006	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	40.000
	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	120.000
	Trucha arcoíris	ovas	EEUU	40.000
	Salmón coho	ovas	EEUU	40.000

Fuente: Dirección de acuicultura (MAGYP) y SENASA

Como consecuencia del trabajo realizado se elaboró la resolución 853/2011, por la cual todos los salmónidos, sus ovas o gametas que ingresen al territorio nacional deben pasar por un predio cuarentenario, antes de ser

liberadas al establecimiento de destino. En la Tabla 10 se vuelca la información respecto a la condición sanitaria de las tres enfermedades, para los países desde los cuales se han realizado importaciones de ovas o alevinos (WAHIS OIE 2014).

Los establecimientos nacionales que proveen alevinos de trucha arcoíris a la zona libre varían año a año. Actualmente son cuatro; dos ubicados dentro de la misma zona y dos extra zona, en la región andina de la provincia de Neuquén (Tabla 11). Todos son monitoreados anualmente previo al traslado al embalse por el SENASA con una muestra de 60 animales por sitio; realizándose un screening total por histopatología y PCR (pooles de 5 animales). Además, la Provincia del Neuquén, a través del Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), realiza controles sobre los reproductores propios (produce alevinos para el embalse), sobre salmónidos silvestres y en los establecimientos del Embalse (el método de diagnóstico es cultivo celular, y derivan los casos sospechosos al SENASA) (Moreno, 2013).

Tabla 10

Situación sanitaria por país exportador y tipo de enfermedad últimos 10 años

País/ enfermedad	AIS	NHI	SVH
EEUU	2005-2006 limitada a ciertas zonas	2005-2014 limitada a una o más zonas	2005-2006 limitada a ciertas zonas
	2007-2014 no reportada		2007-2008 enfermedad clínica
			2009-2011 sospecha no confirmada
			2012-2014 ciertas zonas Silvestre. Cultivo: NR
Dinamarca	Nunca reportada	Nunca reportada/ Vigilancia general	2005-2007 limitada a una o más zonas.
			2008 enfermedad clínica
			2009 brote
			2010-2012 No reportada
			A partir de noviembre del 2013 declarada libre

Chile	2005-2007 Infección enfermedad subclínica	Nunca reportada 2005-2014	Nunca reportada 2005-2014
	2007-2011 infección enfermedad clínica		
	2012 infección confirmada enfermedad subclínica		
	2013-14 enfermedad confirmada en una a más zonas		

Tabla 11

Entrada de alevinos al embalse año 2014

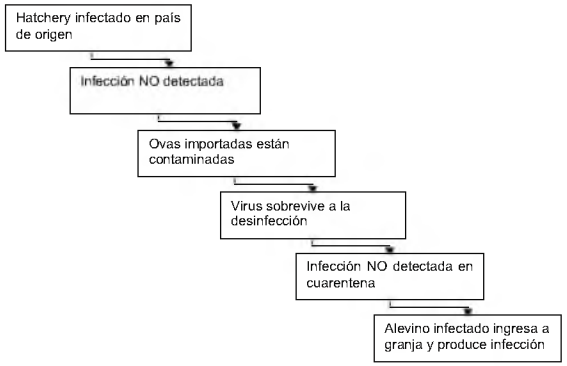
Código del establecimiento productor	**Ubicación del establecimiento**	**Cantidad de alevinos**
A	Extra zona Importación	1.119.250
B	Extra zona	380.000
C	Intra zona	200.000
D	Intra zona	3.194.000

No hay evidencia de traslado ilegal de ovas ni de alevines. Los mismos productores manifiestan conocimiento de los riesgos asociados con el traslado ilegal de animales en defensa del estatus alcanzando.

A modo de ejemplo en la Figura 29 se presenta el árbol de escenarios correspondiente a una de las vías secundarias de esta vía: Importación legal

Figura 29

Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre vía importación legal



Primer evento: hatchery infectado en el país de origen. Se refiere a la probabilidad de que las ovas o alevines que se importen legalmente provengan de un país en el cual el agente en estudio está presente. La probabilidad de que este evento se cumpla está estrechamente vinculada a la prevalencia de hatcherys infectados en el país de origen. Para VHS los países de origen (EEUU y Dinamarca) aún tenían la infección en la época en que se importaba. Dinamarca se declaró libre en noviembre de 2013. Desde el año 2010 no se realizan importaciones de ovas o alevines destinados al Embalse.

Segundo evento: la infección no se detecta. Se asume que si la infección es detectada en el país de origen, los Servicios Veterinarios Oficiales no emitirían el correspondiente certificado de exportación. Por lo tanto, la ocurrencia de este evento está limitada al período ventana, entre la infección del hatchery y su detección, durante el cual se podrían realizar exportaciones de producto infectado.

Tercer evento: se refiere a la probabilidad de que las ovas estén contaminadas, dado que el hatchery lo está.

Cuarto evento: el virus sobrevive a la desinfección. Las ovas son sometidas a un proceso de desinfección, no así los alevines.

Quinto evento: infección no detectada en cuarentena. Estos productos de importación son sometidos a un período de cuarentena, donde se aplican pruebas diagnósticas para la detección de agentes patológicos. La probabilidad de falla en la detección se debería a la falta de sensibilidad de las pruebas aplicadas.

Sexto evento: alevino infectado ingresa a granja y produce infección. Si los eventos anteriores ocurren, se asume que los productos importados irían directamente a un establecimiento productor y produciría caso de enfermedad.

Este tipo de árbol de escenario (con ajustes según el caso) se realizó para las subvías que componen la vía "Alevinos y ovas embrionadas". Estas subvías fueron: a. importación legal desde EEUU; b. importación legal desde Dinamarca; b. importación legal desde Chile; d. importación legal desde Argentina (desde áreas ubicadas fuera de la zona de estudio); e. importación ilegal desde Chile; f. importación ilegal desde Argentina (desde áreas ubicadas fuera de la zona de estudio).

VII. 1. 1. 2. Vía acuática

Dado que la zona libre no tiene afluentes que permitan la entrada de los agentes, la contaminación del agua solo se podría producir por las siguientes vías de ingreso:

- Peces contaminados silvestres:
  Debido a que la presa del Embalse actúa como barrera física que impide la entrada de animales aguas arriba de la misma, se considero como posibilidades de introducción de patógenos la resiembra de peces, por lo cual fueron consultadas las provincias de Neuquén y Rio Negro respecto a los planes de repoblamiento de salmónidos que realizan en la cuenca.
  La provincia del Neuquén, a través del CEAN con asiento en Junín de los Andes, realiza la reproducción con un plantel propio y cría alevinos tanto de trucha arcoíris como de salmón del atlántico. Para ésta última especie, los reproductores no se han renovado al menos en los últimos diez años. El agua en la cual se realiza el cultivo de peces proviene del Rio Chimehuin, que tiene su origen en el lago Huechulaufquen de vertiente Atlántica. Ocasionalmente se han sembrado juveniles de salmón del Atlántico en el Lago Traful. Los antecedentes registrados por el CEAN son 1.500 ejemplares en el 2002, 3.200 en el 2003 y 500 en el 2007. Como mencionamos anteriormente, el CEAN realiza controles sobre las especies que mantiene como reproductores en su laboratorio propio mediante aislamiento en cultivo celular; no habiéndose registrado ningún caso positivo hasta el momento (Moreno, 2013).
  La Provincia de Río Negro captura reproductores en la zona libre; obtiene las ovas, las fecunda y las traslada al embalse Piedra del Águila, extra zona, donde producen los alevinos. No realiza habitualmente siembra en esta zona salvo en una ocasión con 5.000 alevinos en la naciente del Limay (com. pers. Roa)

- Pescadores deportivos:
  La pesca deportiva se encuentra muy desarrollada en la región. Los equipos de pesca y lanchas utilizadas pueden actuar como fómites en caso de trasladarse desde zonas que tienen distinto estatus sanitario.
  Anualmente las provincias patagónicas y la Administración de Parques Nacionales establecen cupos y emiten licencias de pesca deportiva. El Reglamento de pesca deportiva patagónica indica que es obligatorio que los pescadores que ingresen al país utilicen equipos nuevos de pesca o desinfectados.
  Se recabó información a las distintas administraciones que emiten licencia de pesca deportiva consiguiéndose los datos de Parques Nacionales y la Provincia de la Río Negro, sin información de la Provincia de Neuquén.
  Se procesaron los datos de los años 2012 al 2014, por origen de pescadores nacionales y extranjeros, y los que realizan la modalidad trolling (pesca con embarcación); para cuatro Parques Nacionales: Nahuel Huapi, Lanín, Puelo y Alerces y para la provincia de Río Negro (Tabla 12).

Tabla 12
Licencias de pesca deportiva según modalidad, residente en país y extranjero

Año 2012	Trolling	Residente	Extranjero
Parque Nacional Nahuel Huapi	64	263	39
Parque Nacional Lanín	22	42	15
Parque Nacional Lago Puelo	36	121	471
Parque Nacional Los Alerces	108	110	525
Rio Negro	230	7560	170
Totales	460	8096	1220
Año 2013			
Parque Nacional Nahuel Huapi	23	469	554
Parque Nacional Lanín	10	411	301
Parque Nacional Lago Puelo	27	15	519
Parque Nacional Los Alerces	54	99	1374

Rio Negro	377	11295	479
Totales	**491**	**12289**	**3227**
Año 2014			
Parque Nacional Nahuel Huapi	10	156	257
Parque Nacional Lanín	3	8	142
Parque Nacional Lago Puelo	21	0	49
Parque Nacional Los Alerces	283	310	448
Rio Negro	313	11995	856
Totales	**630**	**12469**	**1752**

Fuente: Parques Nacionales y Provincia de Rio Negro

- Aves silvestres:
  Las aves pueden transportar agentes patógenos. Una de las rutas migratorias intercontinentales que se consideró es la ruta del Pacífico. Rara vez estas aves, que son principalmente aves marinas y costeras, vuelan el recorrido completo de su ruta entre áreas de nidificación e invernada, sino que se detienen en distintos sitios para recuperar energías especialmente en zona de humedales. Otras migraciones se producen dentro de Sudamérica, una de ellas son las migradoras patagónicas, que se reproducen en esta región y a fines de verano migran hacia el norte alcanzando el centro de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (Blanco, 2009). En la zona se encuentran distintas especies tales como cormorán (*Phalacrocorax* spp), patos (*Podiceps* spp, *Anas* spp) y gaviotas (*Larus* sp). En virtud de las migraciones estudiadas, la probabilidad de entrar en contacto con patógenos de áreas infectadas es muy baja (hemisferio norte y a través de la cordillera). Esta vía se considera de riesgo insignificante por lo cual no fue incluido en el modelo.
  La información relevada indica que no todas las pisciculturas utilizan redes para evitar a las aves piscívoras.
- Camiones de traslado de producto procesado y alevinos:
  Parte de la producción chilena de salmón es trasladada por vía terrestre a través del Paso internacional Cardenal Samoré, con destino a Chile en el caso de alevinos o desechos de pescado y a Brasil, el mercado de Buenos Aires y otros destinos vía Ezeiza en el caso de producto final para comercialización. Los camiones transitan por las rutas que bordean a la cuenca alta del Limay.

El transporte de alevinos por este paso internacional está prohibido desde diciembre del 2013. Entre marzo del 2012 y febrero del 2013, circularon 148 camiones (Fuente: SENASA).

La carga registrada mayoritariamente es producto procesado en fresco o refrigerado que se transporta a temperaturas de 0 a 1°C. Según el análisis de riesgo elaborado por Mardones y col. (2014b), el 14,4% de las toneladas de salmón del Atlántico producidas en Chile estarían contaminadas con VAIS, y contendrían como máximo 4 animales infectados, en el caso de trucha arcoíris y salmón coho la probabilidad de infección es insignificante.

El producto congelado se comercializa en menor proporción a una temperatura de -18°C. Los datos de volumen transportado entre los años 2012 y 2014 fueron provistos por SENASA y la Dirección de Economía Pesquera. A partir de los mismos se estimó el número de camiones que transitaron a través del Paso Internacional Cardenal Samoré. (Tabla 13).

Tabla 13

Número estimado de camiones por año y producto

Producto/Año	**2012**	**2013**	**2014**
Congelado	701	783	581
Enfriado - Fresco	2804	3467	4963

Dirección de Economía Pesquera Fuente.: SENASA y base INDEC

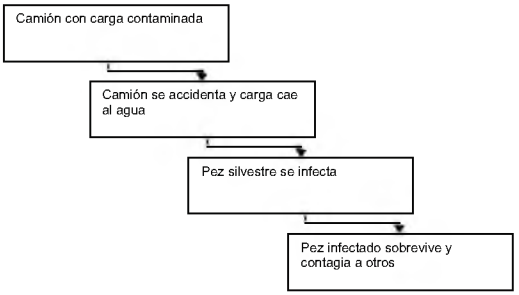
A partir de estos datos no siempre se puede discriminar la especie transportada. Sin embargo, se puede afirmar que mayoritariamente se trata de salmón del Atlántico y en menor proporción trucha arcoíris y salmón coho.

A fin de ilustrar la relevancia de esta vía, se menciona el antecedente registrado en el año 2013, en el cual un camión procedente de Chile transportando pescado entero eviscerado volcó su carga a las aguas del lago Nahuel Huapi (Figura 30). Según trascendidos en la zona, desde el 2010 hasta la fecha se registraron dos accidentes más.

Figura 30
Recuperación de carga del Lago Nahuel Huapi (Fuente: SENASA)

En la Figura 31 a modo de ejemplo se incluye el árbol de escenario de probabilidad de ingreso vía acuática por el transporte de camiones con producto terminado.

Figura 31
Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre vía acuática por camiones



Primer evento: Camión con carga contaminada. El valor de este parámetro fue estimado a partir del estudio de Mardones y col. (2014 b), quienes sugieren que una tonelada de salmón del Atlántico producida en Chile tiene una probabilidad del 14,6% de estar infectada por AIS. Asumiendo que un camión transporta en promedio 20 Tm se estimó que la probabilidad de que un camión transporte carga infectada es en promedio del 95% (Distribución binomial n: 20; p: 0,14).

Segundo evento: Camión se accidenta y la carga cae al agua. Desde el 2010 se ha registrado formalmente un accidente con vuelco de carga a la cuenca y según trascendidos habrían ocurridos otros dos accidentes de este tipo. Asumiendo entonces que se produjeron tres accidentes en los últimos cuatro años se esperarían 0,75 accidentes por año. De los datos presentados en la Tabla 13, se estimó que el número de camiones que circulan anualmente sería de 4.500. Por lo tanto, la probabilidad promedio de accidente sería de 0,75/4.500.

Tercer evento: Pez silvestre se infecta. Para que este evento ocurra la contaminación del agua ocasionada por el accidente debería aportar una cantidad de virus viable y suficiente para infectar animales silvestres. Nuevamente, a partir del estudio de Mardones y col. (2014 b) se sugiere que una tonelada contaminada con VAIS contendría en promedio 1 pez infectado (máximo 4). A partir de estos datos se asume que la carga viral es muy baja. A esto se suma que la única especie susceptible a la infección natural presente en la zona es

el salmón del Atlántico, que presenta una baja densidad poblacional. Por lo tanto, los parámetros determinados para este evento incluyeron una probabilidad insignificante y una gran incertidumbre.

Cuarto evento: Pez infectado sobrevive y contagia a otros. Si bien un salmón del Atlántico infectado tendría una alta probabilidad de sobrevivir el tiempo suficiente para transmitir la enfermedad, la densidad poblacional de esta especie en la zona es relativamente baja, lo cual dificulta la transmisión. Por lo tanto a este parámetro se le asignó un valor bajo con una alta incertidumbre.

Las subvías incluidas en esta vía son: a. siembra de especies silvestres desde Rio Negro, b. siembra de especies silvestres de Neuquén c. pescadores deportivos d. camiones de traslado de productos procesados.

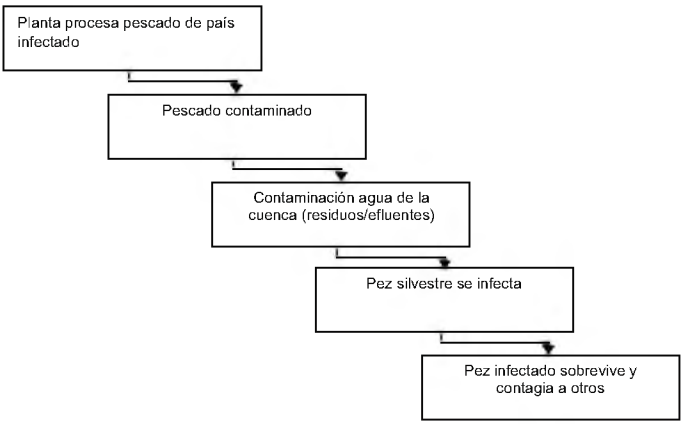
VII. 1. 1. 3. Plantas procesadoras en la zona

Existen ocho establecimientos en la ciudad de Bariloche y sus alrededores. Todos tienen habilitación Nacional (SENASA) Provincial o Municipal. Los dos más grandes procesan exclusivamente trucha del embalse Alicura. Las otras cinco procesan a menor escala y producen exclusivamente trucha ahumada proveniente de la zona. Uno procesa salmón fresco entero eviscerado proveniente de Chile en muy baja cantidad 20 Tm al año (Ochoa, com. pers), lo filetea y lo comercializa en restaurantes de la zona como producto ahumado, fresco o congelado.

Las distintas autoridades sanitarias exigen a los establecimientos que los desechos sólidos se traten como residuos especiales. Estos establecimientos poseen habilitación municipal y sus residuos son enviados al basurero municipal ubicado a más de 3 km del Lago Nahuel Huapi, lo cual no permitiría la llegada de patógenos al cuerpo de agua. Respecto al vertido de efluentes líquidos, los establecimientos poseen una cámara de desengrasado y una cámara purificadora con un tratamiento de 0,8 a 1 ppm de cloro. Una vez tratados los efluentes, son vertidos a la cloaca por la que son derivados a una planta de tratamiento municipal.

En la Figura 32 se presenta el árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre por las plantas de proceso que operan en la misma.

Figura 32
Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre por las plantas de proceso.



Primer evento: Planta procesa pescado de país infectado. Se refiere a la probabilidad de que una planta procese pescado de origen de riesgo. Una única planta de la zona procesa pescado proveniente de Chile. De las 1200 Tm que anualmente se procesan en la zona, 20 Tm. son de salmón del Atlántico de origen chileno. Por lo tanto la probabilidad de que una planta procese producto de origen riesgoso es de 20/1.200.

Segundo evento: Pescado contaminado. Se refiere a la probabilidad que el producto esté contaminado. Del estudio de Mardones y col. (2014 b) surge que la probabilidad de que una tonelada de producto esté contaminada es de 14,6%

Tercer evento: Contaminación agua de la cuenca por residuos/efluentes. Probabilidad de que los residuos sólidos y efluentes contengan el virus viable, en cantidad suficiente y que llegue al agua del Lago. Como se mencionó anteriormente la carga viral de una tonelada contaminada es baja y además tanto los residuos como los efluentes sufren el tratamiento descripto anteriormente. Por lo tanto la probabilidad asignada a éste evento fue insignificante.

Cuarto evento: Pez silvestre se infecta La única especie susceptible a la infección natural presente en la zona es el salmón del Atlántico, que presenta una baja densidad poblacional. Por lo tanto, los parámetros determinados para este evento incluyeron una probabilidad insignificante y una gran incertidumbre.

Quinto evento: Pez infectado sobrevive y contagia a otros. Si bien un salmón del Atlántico infectado tendría una alta probabilidad de sobrevivir el tiempo suficiente para transmitir la enfermedad, la densidad poblacional de esta especie en la zona es relativamente baja, lo cual dificulta la transmisión. Por lo tanto a este parámetro se le asignó un valor bajo con una alta incertidumbre.

Ésta vía no está compuesta por diferentes subvías.

VII. 1. 1. 4. Transmisión por vía mecánica

1. Alimento para peces: uno de los riesgos de introducción de enfermedades es la utilización de alimento para peces que tenga en sus componentes harina de pescado proveniente de peces portadores y que el tratamiento para su elaboración no elimine el virus. Existen tres proveedores de alimento:
   A. Proveedor 1: No se pudo obtener la información del fabricante.
   B. Proveedor 2: La fórmula alimentaria contiene harina de pescado proveniente de Chile (Corpesca SRL), cuyo origen es de pesca extractiva según la información recabada y con productos certificados por la autoridad sanitaria. Por otro lado aunque proviniera de los desechos de la industria del salmón, los procesos para la obtención de la harina harían inviable a estos agentes. A esto se suma el proceso de elaboración del alimento (temperatura máxima alcanzada de 150°C y tiempo de retención de 3 minutos, proceso de secado a temperaturas de 90 a 110°C durante 20 minutos). Este tipo de tratamiento inactivarían los virus (Torgensen, 1993).
   C. Proveedor 3: este proveedor no utiliza harina de pescado en su formulación dietaria, solo utiliza un baño de aceite de pescado.
   Para calcular cuantas toneladas de alimento se consumen, se utilizó un factor de conversión relativos (FCR) de 1: 1,4, calculándose los porcentajes de por establecimientos: Proveedor 1: 350 Tm 26%; Proveedor 2: 896 Tm 66%; Proveedor 3: 105 Tm 8 %(Demicheli y col. 2012)
2. Visitantes o vehículos:
   Tanto los visitantes como sus vehículos pueden actuar como fómites. En diferentes puntos estratégicos de la Región Patagónica existen puestos de desinfección, pero estos no son específicos para este tipo de patógenos. Algunos establecimientos tienen implementadas medidas de bioseguridad para el ingreso de vehículos rodantes y a la entrada del personal en el agua.

3. Equipo contaminado:

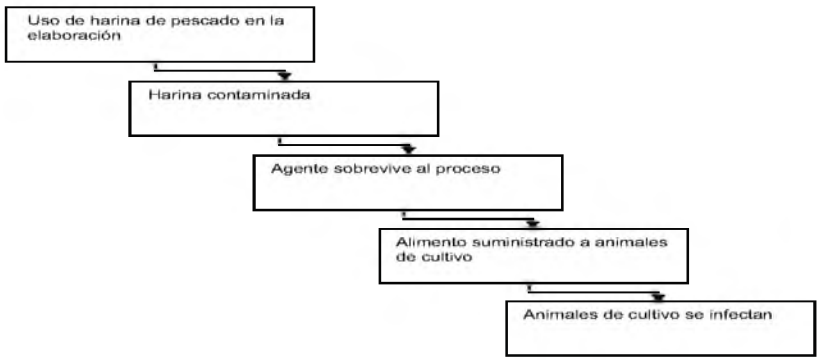
Los únicos equipos potencialmente peligros son las redes de segunda mano. Los productores de truchas utilizan las redes para la construcción de jaulas. Las redes no se fabrican en el país, provienen de Chile. Tomando en cuenta la cantidad de jaulas en la zona (CEAN 2012), se estimó que el uso de redes alcanza los 45.000 m^2, con una vida útil de 6 años en promedio. Esto implica que se necesitan renovar 7.500 m^2 por año.

En la actualidad se importan de un único proveedor. Pueden ser nuevas o usadas, las primeras no representan ningún riesgo. Las redes recicladas, que previamente se utilizan para la producción de salmónidos en Chile, se someten a un proceso de desinfección que garantiza su inocuidad. Además en los últimos años solo se utilizan redes nuevas. Por lo que no se incluye este factor en el análisis de riesgo.

En la Figura 33 a modo ilustrativo se muestra el árbol de probabilidades de ingreso del agente a zona libre por vía mecánica por alimento.

Figura 33

Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre por transmisión por vía mecánica por alimento.



Primer evento: Uso de harina de pescado en la elaboración. Si bien algunos de los alimentos utilizados en la zona contienen harina de pescado, esto no representa un riesgo significativo debido a que el proceso de elaboración de la harina inactiva a todos los agente de interés.

Segundo evento: Harina contaminada. Se refiere a la probabilidad de que el

agente pueda sobrevivir, vinculado a fallas en el proceso de producción o posibles contaminaciones. Se considera que la probabilidad de este evento es insignificante.

Tercer evento: Agente sobrevive al proceso. Se refiere a la probabilidad de que el agente sobreviva al proceso de elaboración del alimento. Este proceso también incluye exposición a temperaturas y tiempos que inactivan a los agentes virales, por lo cual el riesgo se considera insignificante.

Cuarto evento: Alimento suministrado a animales de cultivo. Se refiere a la probabilidad que el alimento contaminado se suministre a los animales de cultivo. En el año 2012 había tres proveedores de alimento en la zona, cada uno proveía diferentes cantidades. En función de éstas se determinó la probabilidad de uso de cada alimento.

Quinto evento: Animales de cultivo se infectan. Se asume que si un animal de cultivo recibe alimento contaminado se infecta.

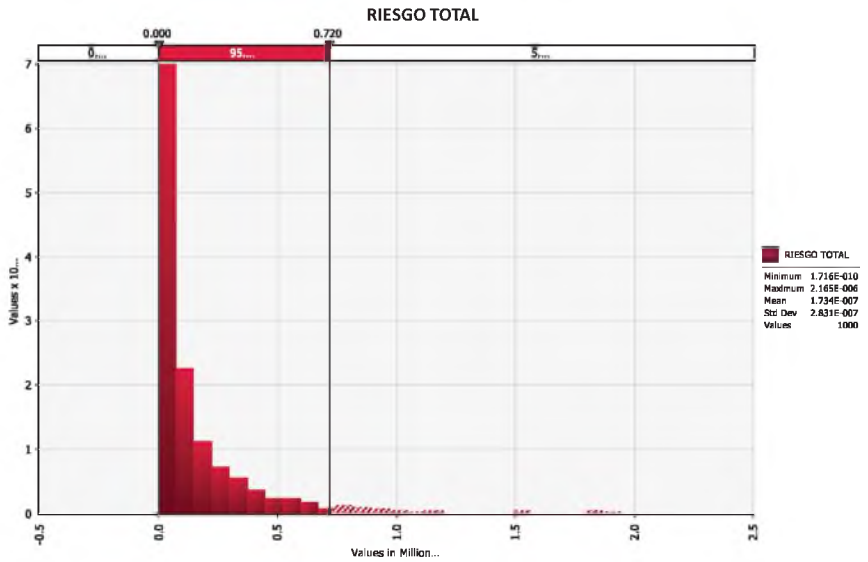
Las subvías incluidas en ésta vía son: a. alimento proveedor 1 b. alimento proveedor 2 c. alimento proveedor 3 d. visitantes a los establecimientos e. equipo contaminado.

VII. 2 Resultados

VII. 2. 1. Modelo AIS

Figura 34

Distribución de probabilidades de introducción del virus del AIS a la zona bajo estudio



Como resultado de 1000 iteraciones se obtuvo una distribución de resultados que puede apreciarse en la Figura 34. En el 95% de los casos el riesgo fue inferior a 0,72 E-6. El resultado más frecuente fue 0, el valor promedio 1,734 E-7 y el valor máximo de 2,165 E-6. Esto representa un riesgo insignificante, o sea que si la situación actual no se modifica la probabilidad de introducción del virus AIS sería extremadamente baja.

La totalidad de este riesgo se debe a la vía acuática, siendo los camiones transportadores de productos y el equipo de los pescadores deportivos, las subvías con probabilidad >0. El riesgo asociado con los camiones transportadores de producto fue en promedio de 1,633 E-7.

VII. 2.2. Modelo SHV

Los parámetros introducidos en este modelo trataron de simular el escenario actual en relación a esta enfermedad: inexistente en el Hemisferio Sur y no se importan ovas o alevinos del Hemisferio norte. Entre las vías identificadas como de potencial riesgo se encuentran los equipos de pesca deportiva provenientes del hemisferio norte. Los datos necesarios para estimar las probabilidades asociadas a esta vía son muy inexactos e impidieron la estimación precisa del parámetro.

Se concluye que en la situación actual el riesgo de ingreso del virus SHV es insignificante, y menor aún que la AIS.

CAPÍTULO VIII - DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis fue determinar la presencia o ausencia en la zona de estudio, la cuenca alta del rio Limay, de los agentes causantes de NHI, SHV y AIS. Si bien se contaba con trabajos previos donde no se hallaron evidencia de estos virus en la zona, los mismos no fueron concluyentes para demostrar la ausencia de estos patógenos, debido entre otras cuestiones al escaso número de animales muestreados, falta de regularidad en el muestreo y a la realización de los estudios en laboratorios no validados por la autoridad sanitaria nacional (Coria y col., 1995; Luchini, 2004).

El estudio de las enfermedades en poblaciones de animales acuáticos debe abordarse de forma diferente que en poblaciones de animales terrestres. Esto se debe a numerosos factores: alta dependencia con el medio ambiente debido a que son animales ectotérmicos, alta interacción entre poblaciones silvestres y de cría, sistemas de producción a menudo complejos (jaulas suspendidas en cuencas hídricas, en sitios marinos, criaderos), poblaciones numerosas en los sitios de cría (sistemas super intensivos a extensivos), dificultad para realizar el muestreo e inspección, entre otras. Más aún, algunos datos básicos como la prevalencia esperada de enfermedades específicas en poblaciones infectadas y el rendimiento de las pruebas diagnósticas, son a menudo desconocidos (Oidtmann y col., 2013).

Por otra parte, para que la condición de libre de ciertos patógenos, sea reconocida internacionalmente se deberá demostrar el estatus sanitario con una determinada regularidad y con una correcta metodología científica. En ese sentido, el Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OIE sugiere los procedimientos que han sido internacionalmente aceptados. El seguir estas recomendaciones permite justificar las medidas sanitarias que los países imponen a las importaciones dentro de su territorio, siempre dentro del marco de la OMC.

El presente trabajo es el primero realizado en Argentina para demostrar ausencia de enfermedad en una población de animales acuáticos, con metodología científica reconocida internacionalmente. Su resultado contribuyó para que el SENASA declarara una zona libre de enfermedades, entre las cuales se encuentran NHI, SHV y AIS.

El muestreo se diseñó para detectar un 2% de prevalencia con un 95% de confianza de acuerdo a lo que sugiere la OIE (Código Acuático, 2006). El tamaño de muestra sugerido por este organismo es de 148 individuos por campaña, valor que fue levemente superado en los ocho muestreos realizados. Esto significa que cada muestreo permitió afirmar con un 95% de confianza que la prevalencia de la enfermedad no superó el 2%, y la probabilidad de error de cada muestreo fue del 5%. Dado que se realizaron ocho muestreos en un período corto de tiempo la probabilidad de error acumulada seria $0.05x10^{8}$, lo que reduce la probabilidad de error a valores cercanos a cero.

Los muestreos se realizaron teniendo en cuenta las distintas estaciones del año y la condición de los animales, ya que la interacción entre el patógeno, el hospedador y el medio ambiente tiene un rol aun más relevante en los animales acuáticos que terrestres. Los peces por ser ectotérmicos, ven afectada su respuesta inmunológica, tanto por temperaturas bajas o muy altas, por ello la repuesta inmune está ligada a los periodos estacionales. (Oidtmann y col., 2013). Otros factores ambientales juegan un rol crucial para que una infección conlleve a una enfermedad clínica, por ejemplo si consideramos el VAIS hay menos probabilidad de infección en agua salada que en agua dulce, sin embargo los brotes de la enfermedad se dan en jaulas en agua de mar (Godoy y col., 2008; Tapia, 2013).

La probabilidad de transmisión de las enfermedades entre animales acuáticos en cultivos intensivos es mayor debido a las altas densidades, lo que permite un ambiente adecuado para el establecimiento del patógeno (Langdon y col., 1988; Oidtmann y col., 2011). Pese a ello, en el presente trabajo se vio la necesidad de tomar muestras de especies silvestres susceptibles, ya que estos cohabitan en los mismos ambientes donde se colocan las jaulas de cultivo (Jensen y col., 2014)

Un elemento crucial para detectar una enfermedad es la capacidad discriminatoria de las pruebas diagnósticas utilizadas, la cual depende fundamentalmente de la especificidad y sensibilidad de las mismas. Según el Manual de la OIE, el aislamiento viral en cultivo celular y es el método de referencia recomendados para las tres enfermedades bajo estudio. Sin embargo por una cuestión de practicidad, accesibilidad y costos, los métodos seleccionados

para la presente tesis fueron la histopatología y la RT-PCR. Según la OIE la capacidad diagnóstica de los métodos de biología molecular para las tres enfermedades estudiadas tienen la misma sensibilidad y especificidad al cultivo celular, cuando se las utiliza para el diagnóstico confirmatorio.

La zonificación es particularmente relevante en el control de enfermedades de animales acuáticos, ya que estos no se adaptan a las medidas de control de enfermedades utilizadas en animales terrestres, como ser el aislamiento y contención en instalaciones (Subasinghe y col. 2005)

La extensión de la zona y sus límites, lo cual es establecido por la Autoridad Sanitaria, tienen que tener reconocimiento legal, estar claramente definida y contar con validez científica, tal como fuera implementada por la Resolución 375 del SENASA que declara la zona libre.

Una zona libre representa un beneficio potencial para los productores involucrados, ya que su capacidad de exportación se ve favorecida por su estatus sanitario, además de estar protegidos ante un eventual caso de estas enfermedades en otras áreas del país. Obviamente, este beneficio se manifiesta solo si la calidad y cantidad de producto son acordes con la demanda de los mercados.

Como ejemplo de las dificultades al comercio podemos señalar la imposibilidad de exportación de langostino al mercado brasilero, que nuestro país tiene restringido, argumentándose el desconocimiento del estatus sanitario de dicha especie de captura; para lo cual se ha implementado también un plan de vigilancia por parte del SENASA.

El mantener una zona requiere de la implementación de medidas de bioseguridad adecuadas que garanticen el mantenimiento del estatus sanitario. Esto significa, entre otras cosas, el estricto control del ingreso de todo tipo de animal, producto o subproducto capaz de vehiculizar los agentes etiológicos.

El término vigilancia tiene varias definiciones. Según el Código Sanitario de los animales Acuáticos (OIE 2014) designa una serie de investigaciones que se llevan sistemáticamente a cabo en una población de animales a fin de detectar la presencia de enfermedades, que pueden consistir en someter a pruebas a la población. Las actividades de vigilancia se pueden llevar a cabo para alcanzar tres objetivos: a) demostrar la ausencia de enfermedad, b) identificar episodios sanitarios c) determinar la presencia o distribución de una enfermedad endémica, incluido los cambios de su incidencia y prevalencia. (Subasinghe y col., 2005; Oidtmann y col., 2011, OIE, 2014).

Además, se deben poner en marcha las acciones de vigilancia epidemiológica que permitan la detección precoz ante un eventual ingreso de alguno de los agentes etiológicos, y preparar de antemano las medidas de contingencia necesarias para implementar una inmediata y efectiva respuesta. Todo esto implica contar con recursos humanos además de laboratorios con una capacidad diagnóstica que cumpla con los estándares internacionales. La participación de los productores en la vigilancia es crucial, para lo cual deben ser correctamente capacitados a fin de conocer los síndromes de notificación obligatoria, los mecanismos para realizar tales notificaciones y las consecuencias asociadas.

En la evaluación realizada se identificaron cuatro vías posibles de introducción de patágenos: importación de alevinos y ovas, vía acuática, plantas procesadoras y transmisión mecánica.

El factor más importante para la introducción de un patógeno es la llegada de peces vivos o huevos al establecimiento de cría. La transmisión vertical no ha sido demostrada en la SHV. En AIS, se ha comprobado la transmisión horizontal, sin embargo debido a un nuevo genotipo del virus del salmón en Chile, existen trabajos que sugieren por similitud una reciente transmisión de Noruega a Chile, probablemente debido a las importaciones de ovas de salmones efectuadas durante varios años (Vike, 2009). Con respecto al virus de la NHI, la transmisión vertical es el único mecanismo que explica la aparición de la enfermedad en nuevos lugares por huevos incubados y eclosionados en aguas libres de patógenos (Winton 1991; Jorgensen, 1992; Rimstad, 2011; Lyngstand y col. 2011). Para evitar la transmisión horizontal una de las medidas de bioseguridad más efectiva es la desinfección de la superficie de los huevos previo al envío y en el destino, lo cual previene en la mayoría de los casos la transmisión del patógeno (Wolf, 1988; Bovo y col. 2005a). En la evaluación de riesgo realizada en el presente trabajo, esta vía de ingreso fue nula. Esto se debe a que hace más de 4 años no se realiza importación de ovas o alevines con destino al cultivo en la zona. Más allá de ello una de las medidas de mitigación que se aplican actualmente en nuestro país, es solicitar los antecedentes del país exportador y el paso previo por una estación de cuarentena de todos los salmónidos que se importen. Esta es una de las vías, que en un futuro si se presenta la necesidad de retomar la importación, se debe tener en especial consideración realizándose el análisis de riesgo correspondiente.

Asumiendo que la zona se encuentra libre de los patógenos, uno de los mayores riesgos detectados en este trabajo fue la vía acuática. Dentro de ella fueron relevantes el traslado de camiones de producto procesado que transitan en la zona, debido al riesgo de accidente y vuelco; y los pescadores

deportivos provenientes de zonas no declaradas libres. Si bien los resultados indican que el riesgo es insignificante para ambos casos, es importante resaltar que a partir de la declaración de zona libre no se permite el tránsito de camiones con alevinos.

En este sentido las medidas de bioseguridad indicadas en el Artículo 5.4.1. del Código Acuático para el transporte de productos en camiones, son :

a) productos de pescado termo esterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121°C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura).
b) productos de pescado pasteurizados que han sido sometidos a un tratamiento térmico a 90°C durante al menos diez minutos o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus.
c) pescado eviscerado, secado por medios mecánicos (es decir, un tratamiento térmico a 100°C durante al menos 30 minutos o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus).
d) aceite de pescado.
e) harina de pescado
f) cueros elaborados con piel de pescado.

Respecto a los pescadores deportivos, es un factor de muy difícil evaluación y control, a pesar que en el reglamento de pesca deportiva patagónica, se menciona la obligatoriedad de usar equipos nuevos o desinfectados.

Otras de las medidas que colaborarían para un mejor manejo de los cultivos por parte de los productores, es la Implementación de la Guía de Buenas Prácticas de producción acuícola para trucha arco iris, que fuera elaborada en forma conjunta por el SENASA y la Agencia de Desarrollo del Neuquén (2010). En dicha guía se sugieren distintos programas para el monitoreo de la calidad del agua, la organización de las áreas de producción y del proceso productivo, que abarca los temas sanitarios, entre otros aspectos.

Uno de los temas también importante es el desarrollo de trabajos de investigación que expliquen las patogenia y como se debe mejorar el control de las enfermedades, especialmente para aquellos patógenos emergentes. Las enfermedades sindrómicas, que son el conjunto de signos lesiones que producen un agente o consorcio de agentes no definidos de un animal, se ha venido detectando en las producciones acuáticas. Como ejemplo de ello se puede mencionar el Síndrome idiopáticos de la trucha, que provocó en Chile en el año 2013 importantes pérdidas y que aun no ha sido identificada

la entidad microbiana que lo provoca. Por lo cual la gestión sanitaria a nivel país es muy importante para la detección temprana de cualquier enfermedad aun aquellas que no tienen un diagnóstico establecido.

En resumen para asegurar la sustentabilidad de la actividad hay que mejorar la eficiencia productiva en cada una de las etapas, a fin de realizar una planificación y manejo adecuado acorde a la especie por lo cual la calidad de los peces va a ser superior y el riesgo de enfermedad será mínimo.

Finalmente es importante el mantenimiento de esta zona declarada libre, manteniendo los controles y reforzando todas las medidas de bioseguridad necesarias para impedir el ingreso a la zona de las enfermedades declaradas libres; ya que a nivel de los productores existen escasas medidas de bioseguridad implementadas a diferencia de lo que ocurre en animales terrestres. Asimismo se debe continuar con el plan de monitoreo que permita demostrar con cierta regularidad que la zona continúa libre, logrando la detección precoz. El desarrollo de planes de contingencia, debe permitir dar una respuesta inmediata para restituir el estatus en caso de ser necesario, además de la capacitación tanto a productores como a profesionales relacionados con el sector.

CAPÍTULO IX - CONCLUSIONES

- Se puede afirmar con un 95% de confianza que los agentes etiológicos de NHI, SHV y AIS no están presentes en la zona bajo estudio con una prevalencia superior al 2%.
- Estos resultados contribuyeron con el SENASA para definir esta zona como libre de patógenos. Esta es la primera zona con este estatus en Argentina para animales acuáticos.
- El riesgo de introducción de SHV a la zona en las condiciones actuales es insignificante.
- El riesgo de introducción de AIS a la zona en las condiciones actuales es insignificante pero mayor que el anterior y se debe principalmente a la vía acuática, y dentro de ella al tránsito de camiones que transporta productos terminados desde Chile y en menor medida a pescadores deportivos.
- Dado que la zona fue declarada libre, se requiere reforzar los controles para impedir el ingreso de los agentes, demostrar con cierta regularidad que la zona continua libre, implementar un programa de vigilancia que garantice la detección precoz, y el desarrollo de planes de contingencia para implementar, en caso de necesidad, una respuesta inmediata que permita recuperar el estatus.

CAPÍTULO X - BIBLIOGRAFÍA

- Aamelfot, M.; Dale, O.B.; Weli, S.; Koppang, E.O.; Falk, K.; (2012). Expression of 4-O-acetylated sialic acids on Atlantic salmon endothelial cells correlates with cell tropism of Infectious salmon anemia virus. J.Virol., 86, 10571–10578.
- Ahne W. (1982). Vergleichende Untersuchung über die Stabilität von vier fischpatogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV) (Comparative studies on the stability of four fish-pathogenic viruses [VHSV, PFR, SVCV, IPNV]). Zentralbl.Veterinarmed. [B], 29, 457–476. (In German).
- Alvarez, M.A.; (2004). Relevamiento de los distintos Lagos y Embalses de la Patagonia. Informe técnico, Dir. de Acuicultura, SAPyA.
- Arkush, K.D.; Mendonca, H.L.; Mc Bride, A.M.; Yun, S.; Mc Dowell, T.S.; Hedrick, R.P.; (2006). Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Dis. Aquat. Org., 69, 145–151.
- Arratia, G.; Peñafort, M.B.; Menu-Marque, S.; (1983). Peces de la región sudeste de los Andes y sus probables relaciones biogeográficas actuales. Deserta, 7: 48-107.
- Baigún, C.; López, G.; Dománico, A.; Ferriz, R.; Sverlij, S.; Schenke, R.; (2002). Presencia de *Coridoras paleatus*, una nueva especie brasílica en el norte de la Patagonia (Río Limay) y consideraciones ecológicas relacionadas con su distribución. Ecología Austral 12: 41-48.
- Biacchesi S.; Le Berre M.; Le Guillou S.; Bennansour, A.; Bremont, M.; Quillet, E.; Boudinot, P.; (2007). Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. J. Fish Dis., 30, 631–636
- Blanco, M.M.; Gibello, A.; Fernández-Garayzábal, J.F.; (2000). Influence of fish health management: Bases, procedures and economic implications. Options méditerranéennes, vol. 51. Global quality assessment in Mediterranean aquaculture (pp. 45-49).

- Blanco, D. E.; (2009). Ecología y comportamiento de aves silvestres migratoria y la influenza aviar. Taller Internacional de Vigilancia de Aves Silvestres: Herramienta global contra la Influenza Aviar, Santiago de Chile, Chile.
- Bondad-Reantaso, M. G.; (2004). Trans-boundary aquatic animal diseases/pathogens. Aquaculture Asia Vol. IX N° 2, pp 24-28.
- Bondad-Reantaso, M.G.; McGladdery, S.E.; East, I.; Subasinghe, R.P. (eds.); (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper No. 402, Supplement 2. Rome, FAO 2001. 240 p.
- Bootland L.M.; Leong J.C.; (1999). Infectious hematopoietic necrosis virus. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, Oxon, UK, 57–121.
- Bovo, G.; Håstein T., Hill, B.; Lapatra, S.; Michel, C.; Olesen, N.J.; Shchelkunov, I.; Storset, A.; Wollfrom, T.; Midtlying, P.J.; (2005a). QLK2-CT-2002-01546: Fish Egg Trade Work package 1 report: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents, 1–35. VESO, P.O. Box 8109, Dep., N-0032 Oslo, Norway.
- Bovo, G.; Hill, B.; Husby, A.; Håstein, T.; Michel, C.; Olesen, N.J.; Storset, A.; Midtlyng, P.; (2005b). Fish Egg Trade Work package 3 report: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection, 1–53. VESO, P.O. Box 8109 Dep., N-0032 Oslo, Norway.
- Christiansen, D.H.; Østergaard, P.S.; Snow, M.; Dale, O.B; Falk, K.; (2011). A low-pathogenic variant of infectious salmon anemia virus (ISAV1 - HPR0) is highly prevalent and causes a non-clinical transient infection in farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.) in the Faroe Islands. J. Gen. Virol., 92, 909–918.
- Coria, C. O, 1991. Informe preliminar sobre el estado sanitario de los salmónidos en la provincia del Neuquen. CEAN-JICA: Informe técnico 13 pp.
- Coria, C. O., Mendoza, J. L.; Sakai, D. K.; (1995). Pruebas virales en salmónidos patagónicos: Primer registro oficial en Argentina. Informe Técnico 17 CEAN.
- Dannevig, B.H.; Falk, K.; Namork E.; (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. J. Gen. Virol., 76, 1353–1359.

- Demichelli, M.; Moreno, P.; Torres, W; Garrido, E.; Molinari, L.; Hualde, P.; (2013). Relevamiento de la producción acuícola e la provincia de Neuquén. Informe preliminar CEAN.
- Devold, M.; Krossoy, B.; Aspehaug, V.; Nylund, A.; (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. Dis. Aquat. Org., 40, 9-18
- Dirección de Recursos Hídricos (2005). Catálogo de Lagos y Embalses de la Argentina;), Buenos Aires, Argentina.
- Duesund, H.; Nylund. S.;Watanabe, K.; Ottem, K.F; Nylund, A.; (2010). Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) at a marine site oon the west coast of Norway. Virol J 7:19
- Emmenegger, E.J.; Meyers T.R.; Burton T.O.; Kurath, G.; (2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. Dis. Aquat. Org. 40: 163–176.
- Enzmann, P.J.; Castric, J.; Bovo, G.; Thiery, R.; Fichtner, D.; Schütze, H.; Wahli, T.; (2010). Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), a fish rhabdovirus, in Europe over 20 years: implications for control. Dis.Aquat. Org., 89, 9–15.
- Enzmann, P.J.; Kurath, G.; Fichtner, D.; Bergmann, S.M.; (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European IHNV isolates from North-American genogroup M. Dis. Aquat. Org., 66, 187–195.
- European Food Safety Authority; (2008). Scientific Opinion of the Panel on AHAW on a request from the European Commission on aquatic animal species susceptible to diseases listed in the Council Directive 2006/88/EC. The EFSA Journal (2008) 808, 1-144
- Falk, K.; Namork, E.; Rimstad, E.; Mjaaland, S.; Dannevig, B.H.; (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (Salmo salar L). J. Virol., 71, 9016–9023.
- FAO; (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 253 págs.
- Fernández-Alonso, M.; Rocha, A.; Coll, J.M.; (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. Vaccine, 19:3067-3065.

- Garver, K.A.; Batts, W.N.; Kurath, G.; (2006). Virulence comparisons of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) U and M genogroups in sockeye salmon and rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health, 18, 232–243.
- Gemmeke, E.; Batho, H.; Bonbon, E.; de Leeuw, P.; Bruschke, C.; (2008). Compartamentalisation and zoning: Dutch perspective. Revista Sicence technologie, OIE 2008, 27 (·) 679-688.
- Giménez, N.; Coll, J.; Estepa, A.; Tafalla, C.; (2005). Futuro de las vacunas ADN frente a Virus en acuicultura. AquaTIC, n°23, pp.20-35. Año 2005.
- Godfray, H.C.J.; Beddington, J.R.; Crute, I.R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.F.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S.M.; Toulmin, C. (2010) Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. Science, 327, 812-818.
- Godoy, M.G.; Aedo, A.; Kibenge, M.J.; Groman, D.B.; Yason, C.V.; Grothusen, H.; Lisperguer, A.; Calbucura, M.; Avendaño, F.; Imilán, M,; Jarpa, M.; Kibenge, F.S.; (2008) First detection, isolation and molecular characterization of infectious salmon anaemia virus associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (Salmo salar) in Chile. BMC Vet Res.2008;4:28.
- Godoy, M.G.; Kibenge, M.J.T.; Suarez, R.; Lazo, E.; Heisinger, A.; Aguinaga, J.; Bravo, D.; Mendoza, J.; Llegues, K.O.; Avendaño-Herrera, R.; Vera, C.; Mardones, F.; Kibenge, F.S.B.; (2013). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Chilean Atlantic salmon (Salmo salar) aquaculture: emergence of low pathogenic ISAV-HPR0 and re-emergence of virulent ISAV-HPRΔ: HPR3 and HPR14. Virology Journal 2013, 10:344.
- Goodwin, A.E.; Merry, G.E.; (2011). Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IV b at different temperatures. J. Aquat. Anim. Health, 23, 85–91.
- Guía de Buenas Prácticas de producción acuícola 2010. SENASA y Agencia de Desarrollo del Neuquén, 65 pp.
- Hawley, L.M.; Garver, K.A.; (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. Dis. Aquat. Org., 82, 171–178.
- Henryon, M.; Jokumsen, A.; Berg, P.; Lund, I.; Pedersen, P.B.; Olesen, N.J.; Slierendrecht, W.J.; (2002a). Erratum to "Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout" (Aquaculture, 2002, 209, 59–76). Aquaculture, 216, 389–390.

- Henryon, M.; Jokumsen, A.; Berg, P.; Lund, I.; Pedersen, P.B.; Olesen, N.J.; Slierendrecht, W.J.; (2002b). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. Aquaculture, 209, 59–76.
- Holvold, L.B.; Myhr, A. I.; Dalmo, R.A.; (2014). Strategies and Hurdles using DNA vaccines to fish. Veterinary Research 45.
- Jensen, B. B.; Ersboll, A. K.; Korsholm, H.; Skall, H. F.; Olesen; N. J.; 2014. Spatio-temporal risk factors for viral haemorrhagic spticaemia (VHS) in Danish aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms* Vol. 109: 87-97.
- Johansen, L.H.; Jensen, I.; Mikkelsen, H.; Bjørn, P.A.; Jansen, P.A.; Bergh, Ø; (2011). Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with special reference to Norway. Aquaculture, 315, 167–186.
- Johansson, T.; Einer-Jensen, K.; Batts, W.; Ahrens, P.; Björkblom, C.; Kurath, G.; Björklund, H.; Lorenzen, N.; (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Org.,* 86, 213–221.
- Jones, S. R. M., Groman, D. B. 2001. Cohabitation transmission of infectious salmon anemia virus among freshwater-reared Atlantic salmon. *J. of Aquatic Animal Health* 13. 340-346.
- Jorgensen, P.E.V.; Olesen, N. J.; Lorenzen, Winton, J.R.; Ristow, S.S.; (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, inmunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquatic Animal Health*, 3, 100-108.
- Kibenge, F.S.B.; Garate, O.N.; Johnson, G.; Arriagada, K.; Kibenge M.J.T.; Wadowaka D.; (2001). Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Dis. Aquat. Org.*, 45, 9–18.
- Kim, W.S.; Oh, M.J.; Nishizawa, T.; Park, J.W.; Kurath, G.; Yoshimizu, M.; (2007). Genotyping Of Korean Isolates Of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (Ihnv) Based On The Glycoprotein Gene. *Arch. Virol.*, 152, 2119–2124.
- Kolodziejek, J.; Schachner, O.; Dürrwald, R.; Latif, M.; Nowotny, N.; (2008). "Mid-G" region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 22–30.

- Kurath, G.; Garver, K.A.; Troyer, R.M.; Emmeneggger, E.J.; Einer-Jensen, K.; Anderson, E.D.; (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.*, 84, 803–814.
- Langdon, J. S.; Humphrey, J. D.; Williams, L.M.; (1988). Otubreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout in Australia. *J. Fish Dis.* 11, 93-96.
- Lapatra, S.E.; Fryer, J.L.; Rohovec J.S.; (1993a). Virulence comparison of different electropherotypes of infectious hematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 115–120.
- Lapatra, S.E.; Turner, T.; Lauda, K.A.; Jones, G.R.; Walker, S.; (1993b). Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **5**, 165–171.
- Liotta, J.; (2006). Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina. Serie de Documentos N°3, Pro-Biota FCNyM, UNPL. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la República Argentina.
- Luchini, L.; (2004). Calidad Sanitaria en relación al cultivo de Salmónidos: Lago Nahuel Huapi, Embalses de Alicurá y Piedra del Águila. Dirección de Acuicultura, SAGPyA, pp108.
- Lyngstad, T.M.; Jansen, P.A.; Sindre, H.; Jonassen, C.M.; Hjortaas, M.J; Johnsen, S.; Brun, E.; (2008). Epidemiological investigation of infectious salmon anaemia (ISA) outbreaks in Norway 2003–2005. Prev.Vet. Med., 84, 213–227.
- Lyngstad, T.M.; Hjortaas, M.J; Kristoffersen, A.B.; Markussen, T.; Karlsen E.T.; Jonassen, C.M.; Jansen, P.A.; (2011). Use of molecular epidemiology to trace transmission pathways for infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Norwegian salmon farming. Epidemics, 3, 1–11.
- Maclean, S.A.; Bouchard, D.A.; Ellis, S.K.; (2003). Survey of non-salmonid marine fishes for detection of infectious salmon anemia virus and other salmonid pathogens. In: Technical Bulletin 1902. International Response to Infectious Salmon Anemia: Prevention, Control and Eradication, Miller O. & Cipriano R.C., eds. USDA, APHIS; US Dept Interior, US Geological Survey; US Dept Commerce, National Marine Fisheries Service, Washington DC, USA, 135–143.
- Menni, R. C.; Gomez S. E.; (1995). On the hatitat and isolation of Gymnocharacinus bergi (Osteichthyes: Characidae). Environ Biol.Fish 42: pp. 15-23.

- Mardones, F.O.; Perez, A.M.; Carpenter, T.E.; (2009). Epidemiologic investigation of the re emergence of infectious salmon anemia virus in Chile. Dis. Aquat. Organ. 84, 105-114.
- Mardones, F.O.; Valdés-Donoso, P.; (2014b). Análisis de riesgo cuantitativo de infección de salmones silvestres y de cultivo a partir del virus de la anemia infecciosa del salmón y *Piscirickettsia salmonis*. Informe Técnico EpiVet Chile Ltd.
- Mardones, F.O.; Martínez-López, B.; Valdés-Donoso, P.; Carpenter, T.E.; Perez, A.M.; (2014a). The role of fish movements and the spread of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Chile, 2007–2009. Prev. Vet. Med. (in press)
- Marsh, I.B.; Whittington, R.J.; O´Rourke, B.; Hyatt, A.D.; Chisholm, O.; (2002)Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. Molec. Cell. Probes, 16, 137-151.
- Marshall, S.; Heath, S.; Henriquez, V; Orrego, C.; (1998). Minimally invasive
- detection of Piscirickettsia salmonis in cultivated salmonids via the PCR.
- Applied and Environmental Microbiology 64, 3066–3069.
- Mennerat, A.; Nilsen, F.; Ebert, D.; Skorping, A.; (2010) Intensive farming: evolutionary implications for parasites and pathogens. Evolutionary Biology, 37, 59-67.
- Meyers, T.R.; Winton, J.R.; (1995). Viral hemorrhagic septicemia virus in North America. Ann. Rev. Fish Dis., 5, 3–24.
- Mjaaland, S.; Rimstad, E.; Cunningham, C.O.; (2002). Molecular diagnosis of infectious salmon anaemia. In: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases, Cunningham, C.O.; ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1-2.
- Moreno, P.; (2013). "Pruebas de detección viral en salmónidos mediante aislamiento en cultivo celular durante el año 2012" Informe técnico Laboratorio de Ictiopatología CEAN, Pcia. del Neuquén.
- Nishizawa, T.; Kinoshita, S.; Kim, W-S.; Higashi, S.; Yoshimizu, M.; (2006). Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. Dis. Aquat. Org., 71, 267-272.
- Noguera P y Calzolari A.; (2002). Estado Ictiosanitario en Embalses, Aspectos microbiológicos. Informe de muestreo 1° parte: Embalse Alicura y Río Traful. Convenio CRUB-AIC, Universidad del Comahue.
- OIE; (2006). Código Sanitario para los Animales Acuáticos.

- OIE; (2010). Epidemiologia y programas de lucha contra las enfermedades de los animales. Rev. OIE, pp 43-45.
- OIE; (2014). Código Sanitario para los Animales Acuáticos.
- OIE; (2014). Manual de Tests Diagnósticos para Animales Acuáticos.
- Oidtmann B. C.; Crane, C. N.; Thrush, M. A.; Hill, B.J.; Peeler, E.J.; (2011). Ranking freshwater fish farms for the risk of pathogen introduction and spread. Preventive Veterinary Medecine 102 (2011) 329-340.
- Oidtmann, B. C.; Peeler, E.; Lyngstad, T.; Brun, E.; Jensen, B. B., Stark, K; (2013). Risk-based methods for fish and terrestrial animal diseases surveillance. Preventive Veterinary medicine 112 (2013) 13-26.
- Olesen, N.J.; Korsholm, H.; (1997). Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.,17, 229–233Olesen, N.J.; (1998). Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS). J. Appl. Ichthyol., 14, 173–177.
- Parry, L.; Dixon, P.F.; (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.,17, 31–36.
- Pascual, M.; Cussac,V.; Dyer, B.; Soto, D.;Vigliano, P.; Ortubay, S.; Macchi, P.; (2007). Freshwater fishes of Patagonia in the 21th Century after a hundred years of human settlement, species introductions, and environmental change. Aquatic Ecosystem Health and Management 10: 212-227.
- Pascual, M.; Macchi P.; Urbanski, J.; Marcos, F.; Riva Rossil, C.; Novara, M.; Dell´Arciprete, P.; (2002). Evaluating potential effects of exotic freshwater fish from incomplete species presence-absence data. Biological Invasions 4: 101-113.
- Pedrozo, F.; Alcalde, R.; Manuel, M.; (1997). Estado trófico del Lago Nahuel Huapi y estimación preliminar de su posible evolución. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue; Departamento Provincial de Aguas Provincia de Río Negro.
- Peeler, E.J.; Murray, A.G.; Thebault, A.; Brun, E.; Giovaninni, A.; Thrush, M.A.; (2007) The application of risk analysis in aquatic animal health management.
- Pillay, T.V.R.; Kutty, M.N.; (2005). Aquaculture: Principles and Practices, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Prieto, A. B.; del Valle A. E.; (1996). La salmonicultura en Neuquén y Río Negro. Situación en Octubre de 1996. CEAN-JICA. Editorial Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires. 109 pp.
- Resolución 375 del SENASA, Año 2013. Declaración de zona libre

- Resolución 853 del SENASA, Año 2011. Condiciones Sanitarias para el Registro y Funcionamiento de Predios Cuarentenarios en la Importación de Salmónidos, sus ovas y/o sus gametas a la Republica Argentina.
- Rimstad, E.; Dale, O.B.; Dannevig, B.H.; Falk, K.; (2011). Infectious Salmon Anaemia. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D., eds. CAB International, Oxfordshire, UK, 143–165.
- Rivas-Aravena, A.; Vallejos-Vidal, E.; Martin, M.C.; Reyes-López, F.; Tello, M.; Mora P.; Sandino, A.M.; Spencer, E.; (2011). Inhibitory effect of a nucleotide analog on ISAV infection. J.Virol., 85, 8037–8045.
- Rolland, J.B.; Winton, J.R.; (2003). Relative resistance of Pacific salmon to infectious salmon anaemia virus. J. Fish Dis 26 (9):511-520.
- Scheinert P, Revenga J, Garcia A; (1995). Estado Sanitario de la Ictiofauna del Embalse Alicura, Informe final de la Campaña Noviembre 1994 - Noviembre 1995. Universidad del Comahue 15pp.
- Simko, E.; Brown, L.L.; Mac Kinon, A.M.; Byrne, P.J.; Ostland, V.E.; Ferguson, H.W.; (2000). Experimental infection of Atlantic salmon, Salmo salar, with infectious salmon anaemia virus; a Histological study. J Fish Diseases 2000, 23:27-32.
- Skall, H.F.; Olesen, N.J.; Mellergaard, S.; (2005). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. J. Fish Dis., 28, 509–529.
- Smail, D.A.; Snow, M.; (2011). Viral Haemorrhagic Septicaemia. In: Woo PTK, Bruno DW (eds). Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections v. 3, 2nd edn. CAB International, UK, pp 110-141
- Stone, D.M.; Ferguson, H.W.; Tyson, P.A.; Savage, J.; Wood, G.; Dodge, M.J.; Woolford, G.; Dixon, P.F.; Feist, S.W.; Way, K.; (2008). The first report of viral haemorrhagic septicaemia in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in the United Kingdom, J. Fish Dis., 31, 775–784
- Subasinghe, R.; (2005). Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. Preventive veterinary medicine 67 117-124.
- Subasinghe, R.; McGladery, S.; Hill, B.; (2005). Vigilancia y Zonificación de Enfermedades de animales acuáticos. Documento Tecnico de Pesca 451FAO

- Tapia, E.; Monti, G.; Rozas, M.; Sandoval, A.; Gaete, A.; Bohle, H.; Bustos, P.; (2013). Assesment of the in vitro survival of the infectious salmon anaemia virus (ISAV) under different water types and temperature. Bulletin Eur. Ass. Fish Pathol. 33(1): 3-12.
- Torgersen Y.; Falk K.; Dannevig B. H.; Hektoen H.; Krogsrud J.; (1993). Physical and chemical inactivation of the etiological agent of nfectious salmon anemia (ISA). A qualitative study. European Association of Fish Pathologist, Sixth International Conference, September 5-10, 1993, Brest, Abstracts, p 5.
- Vike, S.; Nylud, S.; Nylud, A.; (2009). ISA virus in Chile: evidence of vertical transmission. Arch. Virol. 154 1-8.
- WAHIS, World Animal Health Information, 2014. OIE.
- Walker, P.J.; Benmansour, A.; Dietzgen, R.; (2000). Family Rhabdoviridae. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Toxonomy of Viruses, Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al., eds. 563–583.
- Walker, P.J.; Winton, J.R.; (2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. Vet Res. 2010 Nov-Dec; 41(6):51.
- Wargelius, A.; Fjelldal, P.G.; Hansen, T.; (2005). Heat shock during early
- somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) Dev Genes Evol (2005) 215: 350–357.
- Wegrzyn, D.; Ortubay, S; (2006). Salmónidos en la Patagonia, 1er ed. vol I.
- Wicki, G.; Luchini, L.; (1996). Evaluación del potencial para acuicultura en la Región del Comahue (provincias de Neuquén y Río Negro). Información Básica. Ed. Dirección de Acuicultura-SSPesca-SAGPyA: 52 pp y Anexos.
- Williams, K.; Blake, A.; Sweeney, A.; (1999). Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. Journal of Clinical Microbiology 37: 4139-4141.
- Winton J.R.; (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **1**, 83–93.
- Winton, J.R.; Einer-Jensen, K.; (2002a). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases. Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 49-79.

- Winton, J.R.; (2002b). Fish Health Management chapter 9 in: Fish Hatchery Management, second edition. American Fisheries Society, pp 559-639.
- Wolf, K.; (1988). Viral hemorrhagic septicemia. In: Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 217–249.

CAPÍTULO XI - ANEXOS

XI .1. Anexo 1: Protocolo Extracción de ácido ribonucleico ARN de tejidos de peces Salmónidos

Reactivos: Kit comerciales para la extracción de ARN total mediante sistema de columnas:

- RNeasy mini Kit (Qiagen)
- RNeasy Mini Spin columns (rosados)
- Tubos de recolección de 1.5 ml
- Tubos de recolección de 2ml
- Buffer RTL
- Buffer RW1
- Buffer RPE (concentrado)*
- Agua libre de Rnasas
- RQ RNAse free DNAse (Promega)

*Agregar 4 volúmenes de 100% etanol de acuerdo con las instrucciones que figuran en la etiqueta del frasco antes del uso, para obtener la solución de trabajo.

Kit SV Total RNA Isolation system (Promega)

- Wizard SV mini columnas y Tubos de recolección de 2ml (Spin column assemblies)
- Buffer de lisis ARN RLA
- Buffer de dilución ARN RDA (azul)
- β-Mercaptoetanol (48.7%)**
- DNasa I (liofilizada)#
- Mn Cl_2 0.09 M
- Yellow core buffer (amarillo)
- Dnase Stop solution DSA (concentrado)*[1]
- Buffer de lavado ARN Wash solution (RWA)*[2]

- Agua libre de nucleasas

*Agregar 1ml de β-Mercaptoetanol al Buffer de Lisis ARN RLA antes de comenzar el procedimiento.

Reconstituir la enzima DNasa en agua libre de nucleasas, para obtener la solución de trabajo.

[1] Agregar 100 ml de etanol 95 % para obtener la solución de trabajo.[2] Agregar 8 ml de etanol 95 % para obtener la solución de trabajo.

- Agua grado Biología Molecular Libre de Nucleasas o agua bidestilada tratada con DEPC
- β-mercaptoetanol
- Etanol 100 %
- Etanol 95 %
- Etanol 70%
- RQ DNAsa/RNAsa free (Promega)
- Control Negativo (tejidos de órganos de Peces SPF)

Procedimiento:

1.- Extracción de ARN con RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Para la extracción de ARN se procede de acuerdo al protocolo de purificación de ARN total usando RNeasy Mini Kit (Purificación de ARN total de tejidos animales, células, bacterias y repurificación de ARN):

1. Se toman entre 20-30 mg de tejido de distintos órganos (Pronefros, Bazo, hígado, corazón, ovas embrionadas, alevinos) y se colocan en un micro tubo de 1.5 ml estéril y con un micro pistillo estéril se procede a triturar y homogeneizar la muestra. Se trabaja en hielo o cryoracks.
2. Se agrega buffer de lisis del kit (buffer RLT) 600ul + β Mercapto etanol (10ul/1 ml Buffer RLT) y se continua con la homogenización. Se centrifuga el lisado 3' a 12 k rpm.
3. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo micro tubo de 1.5 ml y se agrega 1 volumen etanol 70% (preparado con agua tratada con DEPC y Etanol absoluto grado biología molecular). Se transfieren hasta 700 µl por vez de la muestra, a una columna RNeasy del kit.
4. Se centrífuga a 12.000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se descarta el líquido que paso a través de la columna. Utilizando el mismo tubo de recolección de la columna se carga el resto de la muestra y se repite el paso 3.

5. Se descarta el líquido que paso a través de la columna. Se agregan 700 µl de buffer RW1 a la columna Rneasy y se centrífuga a 10.000 rpm durante 15 s. Se descarta el líquido que paso a través de la columna.
6. Se agregan 500 µl de buffer RPE a la columna Rneasy y se centrífuga a 12.000 rpm durante 15 segundos. Luego se descarta el líquido que paso a través de la columna.
7. Se repite el paso 6, agregando 500 µl de RPE a la columna Rneasy y se centrífuga a 12.000 rpm durante 2 minutos. Se descarta el tubo con el líquido que paso a través de la columna. Se utiliza un nuevo de recolección donde se introduce la columna Rneasy, se centrífuga a máxima velocidad durante un minuto para eliminar cualquier resto de etanol que pueda quedar.
8. Se transfiere a la columna Rneasy a un nuevo tubo de 1.5 ml proporcionado por el kit y se agrega 30-50 µl de agua libre de nucleasas. Se centrífuga a 14.000 rpm durante 1 minuto. Se puede repetir el paso 8 para obtener más ARN. Se obtiene el ARN purificado de alta calidad, eluído en agua RNAasa free.

Luego de la extracción se procede a descontaminar el ARN extraído con la enzima DNAsa para digerir cualquier resto de ADN que pueda quedar e interferir en la reacción posterior de RT-PCR. Se toman 5 ul de la elución de ARN purificado a analizar por RT-PCR y se realiza una digestión con DNAsa/RNAsa free (Promega Corp). Las muestras con la enzima se incuban a 37 °C durante 30-60 minutos. Luego se inactiva la DNAsa a 65°C agregándole 1 µl de stop solution durante 10 minutos. Las muestras de ARN se conservan a – 70 °C +/- -3°C.

2.- Extracción de ARN con el Kit SV Total RNA Isolation System (Promega)

Para la extracción de ARN se procede de acuerdo al Protocolo de Purificación de ARN total de tejidos animales usando SV Total RNA Isolation System (Promega).

1. Se toman entre 20-30 mg de tejido de distintos órganos (Pronefros, Bazo, hígado, corazón, ovas embrionadas, alevinos) se colocan en un microtubo de 1.5 ml estéril y con un micro pistillo estéril se procede a triturar y homogeneizar la muestra. Se trabaja en hielo o cryoracks.

2. Se agrega buffer de lisis del kit (RNA Lysis buffer) y se continua con la homogenización. Se agregan 350ul de RNA Dilution Buffer (componente del Kit) a los 175 ul de lisado, se mezcla por inversión 3-4 veces. Incubar durante no más de 3 minutos en un termobloque o baño termostático a 70°C.
3. Se centrífuga a 12.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfiere a un nuevo tubo de 1.5 ml el sobrenadante y se agregan 200 µl de etanol 95%, se mezcla pipeteando 3-4 veces.
4. Se transfiere la solución a las mini columnas "Spin Column Assembly" y se centrífuga a 10.000 rpm durante 1 minuto. Se descarta el líquido que paso a través de la columna y se coloca la columna nuevamente en el tubo de recolección.
5. Se agregan 600 µl de RNA Wash solution (kit) y se centrífuga a 12.000 rpm durante 1 minuto. Luego se descarta el líquido que paso a través de la columna.
6. Por cada extracción preparar en tubo eppendorf aparte la mix de de digestión por DNasa de la siguiente manera: 40ul de Yellow Core buffer, 5 ul de Mn Cl2 y 5 ul de enzima DNase I (todos componentes del kit) mezclar pipeteando y mantener en frío. Agregar a cada columna en el centro 50 µl de solución de digestión. Incubar 15' minutos a temperatura ambiente (22+/- 3°C).
7. Agregar 200 µl de solución DNase Stop solution (componente del kit) y centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto.
8. Agregar 600 µl de RNA Wash solution (kit) y centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo de recolección y reemplazarlo por uno nuevo.
9. Agregar 250 µl de RNA Wash solution (kit) y centrifugar a 12.000 rpm durante 2 minutos.
10. Se transfiere la columna un nuevo tubo de 1.5 ml proporcionado por el kit y se agrega 100 µl de agua libre de nucleasas. Se centrífuga a 14 000 rpm durante 1 minuto. Se puede repetir el paso 11 para obtener más ARN. Se obtiene el ARN purificado de alta calidad, eluído en agua RNAasa free, conservar a -70°C +/-3°C

XI .2. Anexo 2: Protocolo RT-PCR en un paso (one step) según kit Access RT-PCR System (Promega)

Reactivos:

- Kit comercial RT-PCR one step Access Kit (Promega)
- dNTPs 25 mM
- RNaseout Inhibidor de ARNasas
- ddH2O libre de nucleasas
- Oliogonucleotidos primers: VNHI (IHNV) NFwd 1R, NRev 1R, (OIE), VSHV (VHSV) NFwd, NRev, (OIE), VAIS (ISAV) F ILA1, R ILA2, F Seg U, R Seg L, (OIE).

En todos los casos la metodología a utilizar sigue como referencia los protocolos indicados en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Organismos Acuáticos O. I. E. Quinta Edición 2006 con las siguientes modificaciones:

El procedimiento se divide en varios pasos, cada uno de los cuales se desarrollará en un área separada para los distintos procedimientos en el laboratorio.

- Área de preparación de mezcla (Mix), libre de ácidos nucleícos
- Área para carga de ácidos nucleícos
- Área de amplificación

Procedimiento:

Reacción de RT-PCR en un paso para la detección de:Virus de la Necrosis Hematopoyética infecciosa (VNHI-IHNV) 1 round,Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VSHV-VHSV), y Virus de la Anemia infecciosa del Salmón (VAIS-ISAV).

Preparación de la mix: Preparar una mezcla de 22 µl adicionando los siguientes componentes de acuerdo al orden de la siguiente tabla:

Componentes y volúmenes para la mix de reactivos para RT-PCR en un paso

Componente	Volumen por cada reacción de 22 µl	Concentración final
H20 bidestilada libre de nucleasas	13.625 µl	-
Buffer 5 x AMV / *Tfl*	5 µl	1X
dNTPs 25 mM	0,25 µl	0,2 mM
Primer F	0.5 µl	0.2 µM
Primer R	0.5 µl	0.2 µM
25mM Mg SO4	1 µl	1 mM
AMV RT	0.5 µl	0.1 U/ul
Tfl DNA pol	0.5 µl	0.1 U/ul
RNAse out	0.125 µl	10 U/ul
Volumen total mix	22 µl	

Para el procedimiento diagnóstico se alicuotan 22 µl de mezcla de reacción en cada tubo. Luego se llevan los tubos conteniendo la mix al área para carga de ácidos nucleícos.

Carga de acidos nucleicos: Se sacan las muestras del freezer – 20° C y se las deja descongelar a temperatura ambiente dentro de la estación de trabajo para carga de ácidos nucleícos. Una vez descongeladas las muestras se procede a cargar cada una de ellas al tubo correspondiente conteniendo la mezcla de reacción. Para el procedimiento se cargarán 3 µl de cada muestra. Antes de cargar la muestra se debe homogeneizar mediante pipeteo o manualmente. Una vez finalizado este proceso se llevan los tubos al área de amplificación.

Amplificación de ácidos nucleicos: Para la transcripción reversa y PCR en un paso se aplica el siguiente perfil de amplificación según la siguiente Tabla

Termociclado RT-PCR one step

Síntesis de cDNA	
RT	45° C 45'
Hold inact. AMV	94° C 2'
35 Ciclos de 3 pasos	Perfil de Amplificación PCR
Desnaturalización	94° C 30"
Annealing	55°-60° C 30"
Extensión	72° C 1'
Extensión final	72° C 7'
Hold Final	15° C

XI .3. Anexo 3: Protocolo PCR convencional según kit Go Taq (Promega)

Segundo paso de amplificación PCR convencional para la detección del Virus de la Necrosis Hematopoyética infecciosa (VNHI-IHNV).

Reactivos:

- ddH2O libre de nucleasas
- Kit Go Taq (Promega)
- Mezcla dNTPs 25 mM
- Oliogonucleotidos primers: VNHI (IHNV) NFwd 2R, NRev 2R, (OIE).

Procedimiento: La preparación de la mezcla de PCR se lleva a cabo en la cabina de mix. El procedimiento se debe llevar a cabo sobre hielo granizado, o utilizando crioracks.

Se prepara la mezcla de reacción según la fórmula de la siguiente Tabla

Componentes y volúmenes para el mix de reactivos para PCR convencional VNHI (IHNV) 2do round

Componente	Volumen por cada reacción de 24 µl	Concentración final
H_20 bidestilada libre de nucleasas	17.625 µl	
Buffer 5 x	5 µl	1x
dNTPs 25 mM	0,25 µl	0,2 mM
Primer F 2 round	0.5 µl	02 µM
Primer R 2 round	0.5 µl	0.2 µM
Go taq 10 U/ul	0,125 µl	0,625 U/µl
Volumen total mix	24 µl	

Carga de ácidos nucleicos (2do round): Los ácidos nucleicos a cargar en esta etapa serán los productos de PCR obtenidos del 1er round. Se procede a cargar cada una de las muestras al tubo correspondiente conteniendo la mezcla. Para el procedimiento de VNHI 2R se cargará 1 µl de cada producto. Una vez finalizado este proceso se llevan los tubos al área de amplificación. Se enciende la luz UV del flujo y se deja encendida durante al menos 20 minutos.

Amplificación de ácidos nucleicos (2do round): Para la amplificación de VNHI 2do round se lleva a cabo el siguiente perfil de termociclado:

Termociclado 2do round VNHI

Perfil de Amplificación	**VNHI 2do R**
Hold Desnaturalizacion	94° C 2'
30 Ciclos de 3 pasos	
Desnaturalizacion	94° C 30"
Annealing	50° C 30"
Extensión	72° C 1'
Hold Final	15°C

XI .4. Anexo 4: Electroforesis en geles de agarosa

Reactivos:

- Agarosa grado biología molecular
- Bromuro de Etidio grado biología molecular 10 mg/ml
- Marcador de peso molecular 100 pb
- Buffer de siembra para PCR
- Buffer TBE 0.5 X

Procedimiento: En todos los casos, se debe preparar un gel de Agarosa al 2 % en Buffer TBE 1 X: Se agregan 2 gramos de agarosa a 100 ml de Buffer TBE 1 X (Buffer de electroforesis Tris, acido bórico, EDTA) en un Erlenmeyer de 250 ml. Se lleva a microondas donde se lo lleva a punto de ebullición para disolver la agarosa. Una vez disuelta la agarosa se deja enfriar unos minutos.

1. Luego se agregan 5 µl de Bromuro de Etidio 10 mg/ml, se agita el erlenmeyer suavemente durante unos segundos y se vuelca el contenido dentro de la cama de moldeado (previamente armada con los peines correspondientes) Se espera hasta que el gel solidifique.
2. Se llena la cuba de electroforesis con buffer TBE 1 X, se retiran los peines y se coloca la cama con la agarosa ya solidificada dentro de la cuba de electroforesis, procurando que quede sumergida en el buffer TBE 1 X.
3. En un trozo de Parafilm se mezclan 2 µl de Buffer de siembra 6 X y 10 µl de producto. Luego se carga el total (12 µl). En el caso de los productos de amplificación realizados con el kit Go Taq el buffer de reacción tiene el buffer de siembra incluido y la muestras se cargan directamente en los pocillos del gel (12 µl).
4. En cada línea de peines se debe sembrar al menos una vez el marcador de peso molecular. Una vez finalizada la siembra se enciende la fuente de poder y se inicia la corrida electroforética a 100 v.
5. Una vez finalizada la corrida se procede a observar el gel sobre el transiluminador de luz U.V.

XI .5. Anexo 5: Controles positivos y negativos

Controles positivos

1. Controles Positivos IHNV:
   Cultivo inactivado en buffer AVL Qiamp Viral RNA kit (Qiagen) provistos por:
   Dr J. Winton, Western Fisheries Research Center, 6505 N.E. 65th Street, Seattle, Washington 98115, UNITED STATES OF AMERICA
   Tel.: (1.206) 526.65.87, Fax: (1.206) 526.66.54,
   E-mail: jim_winton@usgs.gov
2. Controles Positivos cultivo VHSV:
   Cultivo inactivado RNAlater (Qiagen) provistos por:
   Dr N.J. Olesen, Danish Institute for Food and Veterinary Research, Hangovej 2,
   DK-8200 Aarhus N,
   DENMARK, Tel.: (45) 89.37.24.31, Fax: (45) 89.37.24.70
   E-mail: njo@dfvf.dk
3. Controles Positivos Cultivo ISAV:
   Cultivo inactivado Buffer AVL Qiamp Viral RNA (Qiagen) y tejido de pronefros infectado en RNAlater (Qiagen) provistos por:
   Dr B. Dannevig National Veterinary Institute, Ullevålsveien 68,
   P.O. Box 8156 Dep., 0033 Oslo, NORWAY
   Tel.: (47.23) 21.64.04, Fax: (47.23) 21.63.01
   E-mail: birgit.dannevig@vetinst.no
4. Controles Positivos ISAV:
   Controles clonados cDNA ISAV purificado y RNA ISAV precipitado en etanol provistos por:
   Dr F. Kibenge Atlantic Veterinary College, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine,
   University of Prince Edward Island 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island, C1A 4P3 CANADA
   Tel: (1.902) 566.09.67 Fax: (1.902) 566.08.51
   Email: kibenge@upei.ca

Origen de los controles negativos

Los controles negativos se obtuvieron de peces SPF (specific pathogens free) certificados, libres de patógenos de las especies *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch,* utilizando la misma metodología anteriormente descripta para la toma de muestras de los individuos a estudiar. Los órganos de los peces SPF

extraídos se conservaron a -80° C Los peces fueron provistos en el 2006 por:
Dr. Esteban Turic Biogénesis Bagó S.A. Argentina.
Ruta Panamericana Km 38,2, Garín - Prov. de Bs.As. ARGENTINA
TEL/FAX: (03327) 448333
Email: info@biogenesisbago.com

XI .6. Anexo 6: Otras lesiones observadas

Tipo de lesión observada	Cantidad	Tasa	Observaciones
Reacción fibrosa de mesotelio	1	0.08	
Necrosis focal hepática	17	1.36	
Infiltrado inflamatorio periductal	5	0.4	
Degeneración grasa de hepatocitos	5	0.4	
Engrosamiento capsula hepática	2	0.16	
Fibrosis hepática peri focal	11	0.88	
Nódulos regenerativos de parénquima hepático	3	0.24	
Focos de linfohematopoyesis con megaloblastía	1	0.08	
Hiperplasia capsulra esplénica	37	2.96	
Congestión esplénica	5	0.4	
Fibrosis esplénica	23	1.84	
Hemorragias focales esplénicas	6	0.48	
Pliegue de la capsula esplénica	1	0.08	
Hiperplasia capsular de pronefros	2	0.16	
Infiltrado inflamatorio en grasa peri renal	1	0.08	
Congestión y hemorragias focales en pronefros	6	0.48	
Formaciones basófilas esféricas pequeñas en pronefros	1	0.08	
Proliferación eosinófila peri vascular y células con estructuras basófilos en pronefros	4	0.32	
Aumento de melanomacrófagos en pronefros	1	0.08	
Material hialino en capsula de Bowman en metanefros	1	0.08	

Tipo de lesión observada	Cantidad	Tasa	Observaciones
Quistes parasitarios (Eimeria) en metanefros	1	0.08	
Mixosporidium en glomérulo renal en metanefro	1	0.08	
Infiltrado de eosinófilos en túbulos del metanefro	4	0.32	
Aumento de melanomacrófagos en metanefros	1	0.08	
Depósito de calcio en túbulos y lesión granulomatosa proliferativa en el intersticio del metanefros	1	0.08	
Granuloma focal intersticial en metanefros	1	0.08	
Depósitos de calcio en túbulos renales del metanefros	1	0.08	
Edema pericárdico	2	0.16	
Exudado pericárdico con infiltración linfoidea	1	0.08	
Miocarditis focal con infiltración linfoidea crónica	5	0.4	
Congestión de vasos coronarios	1	0.08	
Pericarditis	6	0.48	
Hemorragia pericárdica	4	0.32	
Necrosis focal de miocardio	1	0.08	
Infiltración linfoidea difusa	5	0.4	
Parásitos en miocardio	1	0.08	*Diphylobotrium*
Branquias con hiperplasia de laminillas primarias y secundarias	1	0.08	
Hiperplasia distal de laminillas primarias secundarias	3	0.24	
Parásitos macroscópicos en Bazo e Hígado	2	0.16	*Diphylobotrium*
Fibrosis focal en músculo esquelético	1	0.08	
Enteritis necrótica en intestino delgado	1	0.08	
Piel con lesiones fúngicas	1	0.08	Saprolegniasis

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Lista de tablas

Tabla 1: Producción de la pesca y la acuicultura en el mundo (FAO, 2014)..... 15
Tabla 2: Producción por acuicultura por grupo de países..... 15
Tabla 3: Número de muestras tomadas por muestreo y origen..... 49
Tabla 4: Muestreo de Alevinos y ovas..... 50
Tabla 5: Detalle de animales muestreados por especie y sexo en cada campaña..... 65
Tabla 6: Detalle del Peso promedio, Largo total y Largo estándar..... 66
Tabla 7: Detalle de las pruebas diagnósticas por RT-PCR sobre los virus ARN estudiados..... 68
Tabla 8: Resultados del procesamiento por RT-PCR..... 68
Tabla 9: Importaciones de salmónidos a la Argentina..... 76
Tabla 10: Situación sanitaria por país exportador y tipo de enfermedad últimos 10 años..... 77
Tabla 11: Entrada de alevinos al embalse año 2014..... 78
Tabla 12: Licencias de pesca deportiva según modalidad, residente en país y extranjero..... 81
Tabla 13: Número estimado de camiones por año y producto..... 83

Lista de figuras

Figura 1: Evolución de la producción de carnes rojas vs acuicultura (1950-2012)..... 14
Figura 2: Producción por acuicultura 2003-2013 en Argentina (Fuente: Dirección de Acuicultura MAGyP)..... 16
Figura 3: Cuenca alta del rio Limay..... 18
Figura 4: Esquema de virus *Novirhabdovirus*..... 23
Figura 5: A) Exoftalmia y oscurecimiento de la piel B) Branquias bazo e hígado pálidos. (Fuente: CEFAS)..... 25
Figura 6: A: Intestino con células epiteliales negativas y positivas en la lámina propia al VNHI con IHQ (indicado con la

flecha). B: Riñón anterior con IHQ positiva en células hematopoyéticas. (H&E x 400) (Fuente: Fish Pathology).... 26
Figura 7: A) Hemorragias en laminillas branquiales. B) exoftalmia (Fuente:CEFAS)..... 29
Figura 8: Sección de riñón en trucha arcoíris, nótese los melanomacrófagos degranulados, en el tejido hematopoyético H&E x 100 (Fuente: Fish pathology)..... 30
Figura 9: Esquema de un *Isavirus*..... 32
Figura 10: A: Petequias abdominales B: Exoftalmia C: hepatomegalia con oscurecimiento y hemorragias en tejido adiposo (Fuente: Godoy, 2008)..... 34
Figura 11: A corte de bazo con eritrofagia endotelial (H&E x 400). B Necrosis hepatocelular, con hemorragia y congestión sinusoidal (H&Ex 100). (Fuente: Godoy, 2008)..... 35
Figura 12: Embalse Alicura jaulas en producción..... 44
Figura 13: Zona de estudio y sitios de captura de animales silvestres..... 47
Figura 14: Ubicación de los establecimientos productores de truchas en el Embalse Alicura..... 48
Figura 15: Captura y traslado de animales silvestres y de cultivo..... 51
Figura 16: Pasos de necropsias y toma de muestra..... 53
Figura 17: A) Criadero de alevinos B) toma de muestra..... 54
Figura 18: A) Toma de muestras, B) conservación para PCR..... 56
Figura 19: A) inclusión de tejido en paraplast, B) cortes coloreados..... 58
Figura 20: Cortes histológicos de salmónidos muestreados. Presencia de tejidos normales: (A) Riñón anterior, (B) Corazón, (C) Hígado (D) Bazo. Coloración de H&E x 400 (Fuente: DILAB)..... 67
Figura 21: Control de amplificación de ARN con primers sintetizados a partir de la secuencia del ARN mensajero del gen de B actina del Salmo salar..... 69
Figura 22: Resultado de la amplificación por RT-PCR one step VNHI para la núcleo proteína de NHI, 1 round, en gel de agarosa 2 % TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 5R a 81 R muestras de riñón craneal, control Negativo, Blanco y Control positivo (virus de cultivo VNHI) 786 bp..... 70
Figura 23: Resultado de la amplificación por PCR 2° round VNHI para la núcleoproteína de NHI, en gel de

agarosa 2 % TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 1B a 15 B muestras de bazo, control Negativo, Blanco y Control positivo (NHI) 323 bp..... 70
Figura 24: Resultado de la amplificación por RT-PCR one step VSVH para la nucleoproteínas de SVH, en gel de agarosa 2 % TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 5B a 81 B muestras de bazo, control Negativo, Blanco y Control positivo (SVH) 811 bp..... 71
Figura 25: Resultado de la amplificación por RT-PCR one step ISAV para el segmento 8 ILA 1/2, en gel de agarosa 2 % TBE 1 X. MWM 100 bp (Promega), Calle 1C a 15 C muestras de corazón, control Negativo, Blanco y Control Positivo (AIS) 155 pb..... 71
Figura 26: RT-PCR one step ISAV para el segmento 6, en gel de agorosa al 2% TBE 1x MWM 100 pb (Promega) Calle 256R a 306R muestras de riñón, control Negativo, blanco, control positivo..... 72
Figura 27: Zonificación del área declarada libre..... 73
Figura 28: Vías de ingreso de patógenos a zona libre..... 75

Figura 29: Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre vía importación legal..... 79
Figura 30: Recuperación de carga del Lago Nahuel Huapi (Fuente: SENASA)..... 84
Figura 31: Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre vía acuática por camiones..... 85
Figura 32: Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre por las plantas de proceso..... 87
Figura 33: Árbol de escenario de probabilidad de ingreso del agente a la zona libre por transmisión por vía mecánica por alimento..... 89
Figura 34: Distribución de probabilidades de introducción del virus del AIS a la zona bajo estudio..... 91

ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
AIC	Autoridad Interjurisdiccional de Cuenca
AIS	Anemia infecciosa del salmón
ARN	Acido Ribonucleico
bp	Base pairs (pares de base)
CEAN	Centro de Ecología Aplicada del Neuquén
CEFAS	Centre for Environmental, Fisheries and Aquaculture Sciences
DILAB	Dirección General de Laboratorios y Control Técnico
Elisa	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAO	Food Agriculture Organization (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion)
g	Gramos
H&E	Hematoxilina y eosina
HPR	High Polimorfic Region (Región altamente polimórfica)
IFAT	Inmunoflorescencia indirecta
IHQ	Inmunohistoquímica
Kb	Kilo base
Kg	Kilogramo
LS	Largo éstandar
LT	Largo total
MAGyP	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetros

mM	Mili mol
NHI	Necrosis Hematopoyética Infecciosa
nm	Nano mol
NV	Non virion
ºC	Grado Celsius
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMC	Organización Mundial del Comercio
PCR	Polimerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la Polimerasa
Ph	Potencial hidrógeno
RT-PCR	Reverse transcription – Polymerase chain reaction (Transcripción reversa y Reacción en cadena de la polimerasa)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SHV	Septicemia hemorrágica viral
SPF	specific pathogens free (libres de patógenos certificados)
Tm	Tonelada Metrica
U	Unidades
USD	United States Dollar
µm	micrones
µM	micro mol
µl	micro litro
UV	Ultra violeta
VAIS	Virus Anemia Infecciosa Salmón
VNHI	Virus Necrosis Hematopoyética Infecciosa
VSHV	Virus Septicemia Hemorrágica Viral

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, que a través de la Dirección de Acuicultura, me permitieron acceder a la formación de esta maestría además de realizar los aportes financieros e institucionales para la concreción de la misma

Al SENASA, por el apoyo brindado en el desarrollo de esta tesis y en forma especial al Dr. Dillon, quien también brindó la autorización para el desarrollo de esta tesis, y a la Dra. Torres Ledhann que impulsaron este tema desde sus inicios. A los compañeros del SENASA y del MAGyP que trabajaron en las campañas, al igual que a los profesionales del CEAN, en especial a M.V. Leonardo Molinari, Lic. Pablo Moreno y a los profesionales de la AIC y de la provincia de Rio Negro que colaboraron con la captura de los animales silvestres, así como a los productores que nos asistieron permanentemente.

A los profesionales y técnicos del Departamento de Patología y del Departamento de Biología Molecular del laboratorio central del SENASA por su importante labor que permitió concretar los diagnósticos.

Especialmente al Dr. Luis Romano y Mg. Fernando Raibenberg con quienes empecé este trabajo, por su entusiasmo y profesionalismos para concretarlo. A mis compañeros de oficina especialmente a Mabel y Mauro que colaboran en los proyectos con entusiasmo.

A la Dra. Rosana Matiello y al D.r Emilio A. León por dirigirme, compartir sus conocimientos y haber aprendido de ellos.

A mis compañeros de maestría con los que compartí un par de años intensos de estudio, especialmente a Mariana y Andrea como compañeras de estudio.

A la Universidad Nacional de Moreno, sus autoridades y colegas de las Carreras de Licenciatura en Gestión Ambiental y Licenciatura en Biotecnología del Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnologia, por su apoyo para la concreción de esta publicación.

A mis amigos de toda la vida con quienes comparto sus familias y esta pasión por la biología y a mis otros amigos que me hacen vivir en otro mundo distinto que necesito.

Finalmente a mi familia que siempre está a mi lado aún en los momentos más difíciles en forma incondicional.