



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE
LA ENFERMEDAD DEL PÁNCREAS DEL SALMÓN (SPDV),
EN POBLACIONES DE PECES SILVESTRES Y
ASILVESTRADOS. REGIÓN DE LOS LAGOS

RAÚL ALEJANDRO ALEGRÍA MORÁN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: DR. SANTIAGO URCELAY VICENTE

SANTIAGO – CHILE

2010



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE
LA ENFERMEDAD DEL PÁNCREAS DEL SALMÓN (SPDV),
EN POBLACIONES DE PECES SILVESTRES Y
ASILVESTRADOS. REGIÓN DE LOS LAGOS**

RAÚL ALEJANDRO ALEGRÍA MORÁN

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. SANTIAGO URCELAY V.
PROFESOR CONSEJERO: DR. LUIS IBARRA M.
PROFESOR CONSEJERO: DR. PATRICIO RETAMAL M.

**SANTIAGO, CHILE
2010**

I. AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas que formaron parte del desarrollo de esta memoria, de manera particular al Dr. Santiago Urcelay por su disposición y paciencia en la realización de este proyecto. Al Dr. Gabriel Arriagada por el apoyo y dedicación brindado en el transcurso de este año de trabajo. Al Sr. Diego Montecino por su colaboración desinteresada en la toma de muestras realizada en el lago Natri (Chiloé). A la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva Animal (EPIMEP) por su colaboración en realización de esta memoria. Al personal del laboratorio ADL DIAGNOSTIC CHILE por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

Del mismo modo agradezco a mi familia por el apoyo y soporte incondicional, ya que ellos son el núcleo de mi formación, no solo como persona, sino que también como profesional. Sin su soporte difícilmente hubiese logrado cumplir con mis objetivos.

A mis amigos, quienes forman parte fundamental de mi formación como persona y como médico veterinario, quienes estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, apoyándome en el desarrollo de esta memoria.

II. RESUMEN

El virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV), perteneciente al género Alphavirus, familia *Togaviridae*, corresponde a un virus RNA de hebra simple, causante de la enfermedad del páncreas (PD). Presenta un gran impacto económico en los países del hemisferio norte productores de salmones en los que está presente. En respuesta al potencial ingreso de este agente el Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, a través de la Subsecretaría de Pesca incorpora esta enfermedad en la Lista 1 de Enfermedades de Alto Riesgo para las especies Hidrobiológicas, lo que implica su notificación obligatoria.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de este virus (SPDV) en la población de peces silvestres y asilvestrados de 10 lagos de la Región de Los Lagos, con concesiones para salmonicultura, para lo cual se realizó un estudio epidemiológico para demostrar la presencia de un agente patógeno específico, con un muestreo dirigido. Este estudio permite, con una confianza conocida (95%), una prevalencia mínima considerada y conociendo la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de la prueba diagnóstica, determinar la presencia del agente pesquisado. Se determinó una prevalencia mínima de 1% y se consideró una prueba diagnóstica perfecta (100% Se y Sp), arrojando un tamaño de muestra de 297 peces por lago.

Para los lagos Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuín, Huillinco y Cucao, en que se cumplió el tamaño de muestra indicado por el estudio, no se detectó ningún individuo positivo, lo que permite concluir, con un 95% de confianza, que la prevalencia podría ser menor al 1% o que el virus de la enfermedad del páncreas del salmón no se encuentra presente en estos lagos. Para los lagos Natri, Popetán, San Antonio y Tepuhueico en que los resultados siguen siendo negativos, no se logró cumplir con el tamaño de muestra indicado y, por lo tanto, no se puede concluir que el virus no se encuentre en las poblaciones de estos lagos. Estos resultados pueden estar influenciados al no conocer la Se y Sp de la prueba seleccionada permitiendo la ocurrencia de falsos negativos, así como también el posible efecto temporal al realizar el muestreo durante el invierno, época en que es menos probable el desarrollo del virus. Finalmente, se proponen futuras áreas de investigación que permitan realizar una adecuada detección de este agente y la determinación del rol de las especies silvestres.

III. SUMMARY

The salmon pancreas disease virus (SPDV) belonging to the genus Alphavirus, family Togaviridae, corresponds to a single-stranded RNA virus, causal agent of pancreas disease (PD). The disease presents a economic impact in the countries of the northern hemisphere with a developed salmon industry where it is present. In response to the potential danger of entrance of this highly pathogenic agent, the Ministry of Economy, Promotion and Reconstruction, through the Undersecretary's office of Fishing incorporates this disease in List 1 of Diseases of High Risk for the Hidrobiological species, which implies its obligatory notification.

The aim of this study was to determine the presence of this virus (SPDV) in the population of wild and feral fish from 10 lakes in the Lakes District, Chile, with concessions for salmon farming. An epidemiological study was conducted to demonstrate the presence of a specific pathogen agent, with a targeted sampling. This studies allows, with a known confidence level (95%), a minimum estimated prevalence and knowing the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the diagnostic test, to determine the presence of the searched agent. A minimum prevalence of at least 1 % and a perfect diagnostic test (100% Se and Sp) was set up, yielding a sample size of 297 fish per lake.

For the lakes Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuín, Cucao and Huillinco in which the indicated sample size was fulfilled by the study, there was no detection of any positive individual, which leads to the conclusion, with 95% confidence, that the prevalence could be less than 1% or the salmon pancreas disease virus is not present in these lakes. For the lakes Natri, Popetán, San Antonio and Tepuhueico, the indicated sample size was no achieve and the results continue to being negative. Therefore, it cannot be conclude that the virus is not present on the lake´s populations.

Results can be influenced by the ignorance of the Se and Sp of the selected test allowing the occurrence of false negatives, as well as the possible temporary effect of the sampling time, performed during the winter when the development of the virus is less probable. Finally, it proposes future areas of research that allows for the accurate detection of this agent, determining the role of wildlife in the transmission of this and other infectious diseases.

IV. ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. REVISIÓN BILIOGRÁFICA.....	9
3. HIPOTESIS.....	18
4. OBJETIVOS.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6. RESULTADOS.....	28
7. DISCUSIÓN.....	35
8. CONCLUSIONES.....	43
9. RECOMENDACIONES.....	45
10. BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. INTRODUCCIÓN

El auge de la acuicultura en Chile tiene raíces históricas iniciadas a mediados del siglo XIX, mientras que la industria salmonera propiamente tal tiene sus inicios a partir de la década del 60 (Basulto, 2003), época en que se introdujeron especies silvestres de salmónidos, originarias del hemisferio norte, en ríos y lagos del sur de Chile, esto debido a que las condiciones ambientales eran favorables para su desarrollo. En la actualidad la producción se caracteriza por ser un sistema fuertemente intensivo, y por la gran importancia de la salmonicultura en la industria de los alimentos, siendo la acuicultura uno de los sectores con más rápido crecimiento en el mundo y con potenciales de crecer aun más para poder satisfacer la demanda a nivel mundial (Basulto, 2003). La situación en Chile indica que cerca de un 90% de la producción acuícola está destinada al cultivo de salmónidos, entre ellos, salmón coho, salmón del Atlántico (la especie más explotada) y trucha arco iris (SalmonChile, 2009).

El crecimiento explosivo que experimentó la industria salmonera en Chile en los últimos años, llevó a la importación de ovas de diferentes países del mundo, con el fin de poder cubrir las necesidades del mercado. Basta mencionar que Chile ha importado más de mil millones de ovas en estos años, desde diversos países y continentes del hemisferio norte. Es un hecho conocido que al trasladar peces, o sus gametos, sus agentes patógenos se transfieren en conjunto con ellos (Smith *et al.*, 2001). La importación de ovas infectadas es considerada una de las posibles vías de ingreso del virus de la anemia infecciosa del salmón a Chile (ISAv, por sus siglas en inglés), al observarse que genéticamente los aislados chilenos pertenecen al grupo genómico de la Unión Europea y más específicamente a aislados presentes en Noruega, país que envía una gran cantidad de ovas anualmente a Chile (Vike *et al.*, 2009). Esta ruta de ingreso es presentada como probable para el virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV). De allí que, involuntariamente y por errores de manejo, se han introducido una serie de enfermedades infecciosas que no estaban presentes en el país y por lo cual se ha deteriorado paulatinamente el estatus sanitario (Smith *et al.*, 2001; Cameron, 2002; Vike *et al.*, 2009).

Este hecho (ingreso de patógenos a través de los ovas) dificulta el control del ingreso de las enfermedades que hoy afectan a los salmones en Chile. Se agrava la situación si a ello se suma el elevado grado de intensividad de la industria salmonera, y que se

considera que los salmones son una especie altamente susceptible al estrés, lo que juega un rol importante en la respuesta inmunológica que puedan generar frente a patógenos presentes en el medio.

Considerando la tendencia de crecimiento que presentaba la industria salmonera chilena hasta la aparición de la anemia infecciosa del salmón (ISA), cuya presencia se confirmó oficialmente el año 2007, además de enfermedades propias de las especies y de los sistemas de producción; como el síndrome rickettsial del salmón (SRS), la necrosis pancreática infecciosa (IPN), vibriosis, entre otras y el rol en la generación de alimentos de bajo costo y de gran aporte nutricional, es fundamental prestar atención a la emergencia de nuevas enfermedades (Subasinghe, 2005).

El rol de las especies silvestres aún no está definido. Es probable que algunos agentes etiológicos desconocidos hayan estado en forma endémica en las especies nativas sin causarles un daño aparente y se hayan adaptado a estas especies de peces foráneas, las que a su vez no tendrían una constitución genética adecuada, ni memoria inmunológica, para responder con mecanismos de defensa efectivos frente a estos microorganismos (Smith *et al.*, 2001; Murray y Peeler, 2005). Aún más, es posible que estas especies silvestres actúen como reservorio para múltiples agentes y que de esta forma dificulten su prevención, control y erradicación. El rol central de estas especies aún está en duda, aunque ya se presentan antecedentes de presencia de virus en peces silvestres, situación que está siendo analizada en profundidad con tal de entregar información fidedigna y confiable.

En esta relación de enfermedades de peces con salmones se puede mencionar la enfermedad del páncreas del salmón (PD, por sus siglas en inglés), que corresponde a una enfermedad de etiología viral, causada por un Alphavirus, el primero reportado en peces (Weston *et al.*, 1999), que afecta al salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). La enfermedad está presente en numerosos países europeos, en donde ha tenido un impacto económico significativo.

El objetivo de este estudio es determinar la presencia o ausencia del virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV, por sus siglas en inglés) en especies silvestres y asilvestradas en lagos concesionados para producción salmonera en la

Región de Los Lagos (X Región) y de esta forma presentar antecedentes sobre el rol de estas especies en la transmisión de la enfermedad.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad del páncreas (PD) es una enfermedad de origen viral, que fue reportada por primera vez en sitios de cultivo en mar con salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en Escocia, el año 1976 (Munro *et al.*, 1984). Desde su primer reporte se ha diagnosticado en los Estados Unidos, Canadá, Noruega, Irlanda, España, Italia y Francia donde ha generado importantísimas pérdidas económicas. Puede causar mermas significativas dado su elevada morbilidad, mortalidad y la fuerte reducción en la producción (Norris *et al.*, 2008). Por esta situación universidades y empresas de aquellos países afectados han otorgado una serie de recursos a la investigación de esta enfermedad.

Debido a las grandes pérdidas económicas asociadas a brotes de PD en la costa noroeste de Noruega, la enfermedad se incorporó a la lista B de notificación obligatoria según la autoridad de seguridad alimentaria de este país (NFSA, por sus siglas en inglés) a partir del año 2007, situación que no está ajena a la realidad nacional, en que según resolución del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, a través de la Subsecretaría de Pesca con fecha 29 de Agosto del año 2008 la enfermedad del páncreas (PD) se considera en Lista 1 de Enfermedades de alto riesgo para las especies Hidrobiológicas (Chile, 2008.), equivalente a la situación Noruega.

El agente causal de PD es el virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV), aislado por primera vez el año 1994 y que en la actualidad se considera como miembro del género Alphavirus dentro de la familia Togaviridae (Weston *et al.*, 1999), inicialmente asociado a un virus “Toga-like” por su gran cercanía genética (Nelson *et al.*, 1995). Éste es el primero de los alfavirus detectados en peces y presenta una cercana relación genética con el virus de la enfermedad del sueño (SD, por sus siglas en inglés) que afecta a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), por esto se tomó la determinación de agruparlos como SAV's, siglas en inglés para alfavirus de los salmónidos (Weston *et al.*, 2002). A la fecha se han identificado seis subtipos, entre los principales, el SAV 1 causal de PD y que fue aislado en Escocia e Irlanda afectando a salmón del Atlántico, SAV 2 causante de SD en trucha aislado por primera vez en Francia, y SAV 3 aislado únicamente en Noruega y por lo cual se ha denominado SAV de Noruega (NSAV), y que afecta tanto a salmón del Atlántico como a la trucha arco iris, produciendo en ambos PD (Cuadro 1). La organización genómica del NSAV es idéntica a la de SAV 1 y SAV 2, y su

secuencia de nucleótidos es similar a la de estos alfavirus correspondiendo a 91,6% y 92,9%, respectivamente (Hodneland *et al.*, 2005).

CUADRO 1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ESPECIES AFECTADAS POR AISLADOS DE SAV EN EUROPA.

Subtipo SAV	Especies	Países	
SAV 1	Salmón del Atlántico	Irlanda (principalmente Connemara, Escocia).	
SAV 2	Trucha arco iris	Francia, Inglaterra y Escocia, Italia, España, Alemania (sospecha de SAV 2).	
	Salmón del Atlántico	Escocia.	
SAV 3	Trucha arco iris	Noruega	Sólo en mar.
	Salmón del Atlántico	Noruega	
SAV 4	Salmón del Atlántico	Escocia, Irlanda.	
SAV 5	Salmón del Atlántico	Escocia.	
SAV 6	Salmón del Atlántico	Escocia.	

Extraído de McLoughlin y Graham, 2007.

El virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV) corresponde a un virus RNA de hebra simple, de sentido positivo, esférico, con envoltura, la que presenta espinas con copias de las glicoproteínas virales, cada una de estas espinas se encuentra compuesta por trímeros de dos o tres subunidades, las glicoproteínas E1, E2 y E3, donde la glicoproteína E2 parece ser la responsable de la detección del receptor de unión a las células del hospedero. Sensible al cloroformo y rápidamente inactivado en presencia de elevados niveles de materia orgánica a 60°C y con pH 7,2. También se inactiva a pH 3,0 (ácido) y pH 12 (alcalino) a 4°C, esto es sugerente de que el compostaje, el ensilaje y la hidrólisis alcalina podrían ser efectivos en la inactivación del virus en peces muertos y desechos. Crece fuertemente en cloruro de cesio a 1,20 g/mL.

La presentación clínica de la enfermedad del páncreas, como se mencionó anteriormente, afecta tanto al ciclo en agua dulce como en mar y esto se relaciona con el subtipo que esté presente en la región, afectando tanto a salmón del Atlántico como a trucha arco iris. Los principales signos clínicos asociados a esta enfermedad pueden ser, según su

aparición cronológica, inapetencia de aparición súbita, letargia, aumento de la presencia de heces en las jaulas, aumento de la mortalidad y disminución en los indicadores económicos (McLoughlin *et al.*, 2002). Aquellos peces afectados se podrían observar con dificultades para mantener su posición en las columnas/corrientes de agua, producto de daño muscular; este fenómeno predispone a la aparición de erosiones y úlceras en la piel de estos peces, así también quedan más sensibles a la manipulación, lo que puede llevar a muerte súbita. En algunos peces se ha observado la eliminación de pellet de comida por la boca, relacionado con lesiones en las fibras musculares del esófago.

Al realizar una necropsia de un individuo en estadio temprano de un brote de la enfermedad se puede observar, ausencia de alimento en intestino, restos de heces, ocasionalmente petequias hemorrágicas sobre la superficie de ciego/píloro y de la grasa que los rodea. En etapas más tardías aparecen peces anoréxicos con muy mala condición corporal, relacionado a fallas en la recuperación del tejido pancreático. Estos peces están más susceptibles a infecciones secundarias. La necrosis del páncreas exocrino fue la única lesión descrita por histopatología en la primera presentación de la enfermedad en Escocia (Munro *et al.*, 1984); estudios posteriores realizados por Ferguson *et al.*, 1986, extendieron las observaciones patológicas a cardiomiopatías y miopatías de músculo esquelético, concluyendo en este estudio que la lesión más significativa fue la degeneración severa del miocardio, lesiones que han sido demostradas en estudios posteriores.

La enfermedad se puede categorizar en 4 grados, aguda, sub-aguda, crónica y tardía/regenerativa (Taksdal *et al.*, 2007) (Cuadro 2), Graham *et al.*, (2009) aportan antecedentes sobre un estado de portador y por ende persistencia viral, al encontrar que los signos persistían por hasta 265 días en tejido cardíaco y agallas en salmón del Atlántico criados en Irlanda y que presentaron brotes naturales de PD.

Los hallazgos histopatológicos más frecuentemente encontrados en peces con el cuadro clínico a nivel de páncreas corresponde a necrosis del tejido, con una respuesta inflamatoria variable en severidad, las lesiones crónicas se clasifican como pérdida masiva de tejido pancreático, cuando el daño es muy severo estos peces tienden a convertirse en “runts” o “rezagados” (Imagen 1). A nivel cardíaco la lesión principal corresponde a la necrosis multifocal de cardiomiocitos. Afecta tanto al músculo ventricular

como a la musculatura atrial en diferentes grados, desde lesiones leves a severas afectando a toda la musculatura cardiaca. Los peces más jóvenes tienen la capacidad de sustituir el tejido dañado mediante la división de células sanas, lo cual puede resultar en un impacto diferente de la infección en diferentes estados en la producción en mar (smolt vs. adulto) (McLoughlin y Graham, 2007). Las lesiones que ocurren en músculo esquelético tienden a aparecer entre las tres a cuatro semanas posteriores a la aparición de lesiones en páncreas y corazón, por esto, peces muestreados en estados tardíos de la enfermedad pueden sólo presentar estas lesiones. La lesión principal corresponde a degeneración hialina, afectando en mayor medida a las fibras musculares rojas, fibras aeróbicas utilizadas por el pez cuando nada lentamente a una velocidad constante, por sobre las fibras blancas (anaeróbicas, utilizadas cuando el pez debe nadar rápidamente). Estas lesiones musculares explican en parte el comportamiento de nado que presentan los peces afectados y que contribuye significativamente a las mortalidades relacionadas a PD.

CUADRO 2. PRINCIPALES TEJIDOS AFECTADOS EN LOS DIFERENTES ESTADOS DE LA ENFERMEDAD DEL PÁNCREAS DEL SALMÓN.

Estado de PD	Tejidos			
	Páncreas	Corazón	Musc. Esq.	Riñón
Agudo	+	-/+		
Sub-agudo	+	+		
Crónico	+	+	+	+/-
Tardío/regenerativo	+ ^a	(+)	+	+/-

(+) = leve o sin lesiones.
^a 16 de 68 (24%) truchas arco iris mostraron sólo lesiones pancreáticas leves o inexistentes, donde todos los salmones del Atlántico mostraron pérdidas severas de tejido pancreático.

Extraído de Taksdal *et al.* (2007).

En promedio se requieren entre dos a tres meses post transferencia al mar para que el centro de engorda de salmones se infecte, situación descrita por McLoughlin *et al.*, (2002), para la infección con SAV1 en Gran Bretaña. Para la situación de Noruega se describen entre siete a nueve meses, probablemente producto de la menor temperatura del agua presente en las regiones en que se realiza salmonicultura en este país. Sin

embargo, se ha descrito la ocurrencia de brotes de PD tan pronto como cinco a ocho semanas después de que los smolts han sido liberados al mar (Crockford *et al.*, 1999). La duración de un brote en un centro puede variar substancialmente, desde uno a cuatro meses en Irlanda, hasta diez semanas en Noruega.

La mortalidad asociada a la enfermedad ha resultado ser muy variable en relación a los estudios existentes, realizados en su gran mayoría en el Reino Unido y Noruega, mortalidades que alcanzan desde un 2% a un 80% en base a información obtenida para jaulas, además de existir sitios de producción en que a raíz de un brote han llegado a perder hasta un 40% del “stock” total de salmones de un ciclo productivo.

No existe relación entre el subtipo actuante y la patogenicidad o susceptibilidad según especies, aunque Boucher *et al.*, (1995), describen como hospedero principal para SD (SAV2) a la trucha arco iris y establecen un orden de susceptibilidad *O. mykiss* > *S. salar* > *S. trutta*. De la misma forma establecen como hospedero principal para PD (SAV1 y SAV3) al salmón del Atlántico y *S. salar* > *O. mykiss* en cuanto a susceptibilidad y con ésto también aportan antecedentes sobre la infección cruzada. Según un estudio epidemiológico realizado por Rodger y Mitchell (2007), sobre la base de la industria salmonera irlandesa y para brotes de PD ocurridos entre 2003 y 2004 se concluyó que los brotes se presentaban durante todo el año. Pero se determina la existencia de dos períodos en que los riesgos de presentar un brote son más elevados, siendo éstos, inicios de verano e inicios de otoño. La razón más probable asociada a ésto correspondería a la temperatura del agua, que se encontraría entre los 10°C y los 14°C, dado que éstas son las temperaturas óptimas para que el virus crezca en cultivos celulares (Ruane *et al.*, 2008). De esta manera el inicio, duración y severidad de un brote de PD o de SD (dependiendo del subtipo de SAV y de la especie afectada), muestran una variación considerable. Existen evidencias que esta variabilidad puede estar relacionada a la temperatura del agua, factores ambientales como el régimen de alimentación, cepa de smolt y a diferencias regionales (Hodneland, 2006). Por otro lado McVicar, (1987), entrega antecedentes sobre el desarrollo de protección de largo término a nuevas infecciones con SAV, desde poblaciones de peces sobrevivientes a brotes anteriores. De la misma manera Boucher y Baudin-Laurencin, (1996), lograron confirmar esta hipótesis mediante la infección experimental de peces, tanto para infección con SAV1 como con SAV2, es

más, en la misma experiencia se logró determinar el desarrollo de protección cruzada en trucha arco iris contra SAV1 y SAV2.



Imagen 1. Salmón del Atlántico infectado con SAV-1. Típico “runt” producto de PD, pez con mínima grasa corporal y cecal.

El papel que juegan reservorios marinos tales como moluscos, crustáceos, otros peces, ectoparásitos aún no está completamente esclarecido. Es importante hacer notar que los alfavirus son clasificados como arbovirus ya que la gran mayoría de ellos son mantenidos en la naturaleza por un ciclo biológico de transmisión entre hospederos vertebrados y artrópodos hematófagos, usualmente pulgas o mosquitos. En este ámbito, Petterson *et al.*, (2009), realizaron un estudio con la finalidad de determinar el rol de *Lepeophtheirus salmonis*, parásito copépodo, denominado piojo del salmón, en la transmisión y diseminación de PD. En este estudio se buscó detectar SAV-3 desde piojos infestando salmón del Atlántico durante un brote de PD, mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa en Tiempo Real (rRT-PCR), en que el RNA de SAV-3 pudo ser detectado desde los piojos de mar colectados. La detección del virus en el parásito solo indica eso, no entrega antecedentes tales como si el virus es capaz de replicarse en el piojo y por lo tanto infectar otro salmón, o si el origen de ese virus detectado es producto de contaminación superficial de las muestras.

Con un objetivo similar es que Ruane *et al.*, (2008), muestrearon peces silvestres tanto en mar como en agua dulce, ésto ya que cuentan con un rol potencial importantísimo en la

epidemiología de un número de enfermedades virales muy importantes, tales como ISA e IPN (Lyngstad *et al.*, 2008). De este modo, sólo un pequeño número de muestras para uno de los ocho ríos muestreados, arrojó lecturas positivas a la examinación mediante RT-PCR, y los trabajos actuales buscan amplificar este producto y secuenciarlo con la finalidad de poder demostrar que estas muestras eran realmente positivas a SAV. Para el estudio en mar se obtuvieron muestras de tejido renal, cardíaco y de branquias de 11 jureles (*Trachurus murphyi*), individuos que fueron capturados con redes de pesca ubicadas en el perímetro de una jaula centinela durante un brote de PD, arrojando resultados negativos. Existen diagnósticos no publicados de SAV3 desde “smolts”¹ de trucha fario (*Salmo trutta*) presentes en lagos de la costa oeste de Noruega (Plarre², 2010, com. pers.).

La transmisión de la enfermedad es de tipo horizontal y se debe al contacto directo entre peces (Aldrin *et al.*, 2009), ésto ha sido demostrado mediante estudios de cohabitación. Aún se desconoce la manera en que diferentes zonas geográficas puedan infectarse, probablemente el uso de “wellboats”³ pueda estar involucrado; el rol de las especies silvestres aún no se conoce y no se descarta la participación de algún vector, como se menciona más adelante. Fringuelli *et al.*, 2008 realizaron un análisis epidemiológico en base a información de secuencias de 54 SAV aislados de salmón del Atlántico y trucha arco iris, entre los años 1991 y 2007, en sitios de producción en mar y en lagos de Irlanda, Inglaterra, Noruega, Francia, Italia y España, en relación al año de detección y el origen de los peces. Así, aportan evidencia sobre la posible habilidad del virus de persistir por un extenso periodo de tiempo sin la necesidad de que ocurra mutación y apoyan fuertemente las hipótesis sobre la transmisión horizontal de la infección por una circulación local del virus entre centros.

En relación a la transmisión vertical, diversos elementos como suero, tejidos, fluido seminal y ovárico de reproductores han sido testeados para la detección del virus, con resultados variables. Bratland y Nylund, (2009), aportan evidencia a la efectividad de la

¹ “smolt”: salmónidos en etapa juvenil, que se encuentran en una etapa de adaptación fisiológica y física para la vida marina.

² Heidrun Plarre. Departamento de Biología, Universidad de Bergen, Bergen, Noruega. Com. pers. Enero 2010.

³ “wellboats”: Embarcación con grandes tanques de retención para el transporte de peces vivos en diferentes etapas de su desarrollo.

transmisión vertical, al detectar la presencia del virus SAV-3 en ovas de ojos y alevín de salmón del Atlántico cultivados en lagos del sector oeste de Noruega, lugar donde el virus es endémico, y en individuos adultos luego de un año de su introducción al mar, todos estos individuos originados de reproductores infectados. Indicando con ésto que la transmisión vertical es posible y que probablemente se vea influenciada por el título viral presente en los reproductores, aunque la evidencia de campo indica que generalmente estos individuos no alcanzan títulos muy elevados. Sin embargo, no se puede excluir esta teoría ya que el “peak” de carga viral se alcanza mucho antes de que se expresen signos clínicos claros de enfermedad por SAV. Con experiencias realizadas con SAV-1 y SAV-2 la transmisión vertical también se ha logrado mediante la infección por inyección intraperitoneal de los reproductores, alcanzando títulos virales mucho más elevados que en la infección natural (Castric *et al.*, 2005). Por ésto no se puede descartar la transmisión vertical como mecanismo utilizado por los SAV's para la infección de salmones en cultivo intensivo.

Una serie de métodos diagnósticos están disponibles para esta enfermedad. Inicialmente, el criterio diagnóstico se basaba en los signos clínicos e histopatológicos. En la actualidad este acercamiento sólo permite tener una sospecha preliminar, por ésto se han desarrollado una serie de otros métodos diagnósticos. Cronológicamente en relación a su desarrollo, se puede mencionar: ensayos virológicos que incluyen aislamiento del virus desde cultivos celulares, pero no son de mucha utilidad ya que los efectos citopáticos no siempre se presentan o pueden ser poco claros. Se han desarrollado técnicas de inmunotinción utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs), técnica también utilizada en la neutralización viral en sueros de peces infectados, hasta llegar a una prueba con una elevada sensibilidad y especificidad como el PCR; en un inicio la técnica sólo permitía detectar la presencia del virus sin lograr diferenciar el subtipo actuante. Actualmente, la prueba de selección para realizar tanto la detección y cuantificación de carga viral, como la diferenciación del subtipo actuante, corresponde a la técnica descrita por Hodneland y Endresen, (2006), donde se utiliza la técnica de “rRT-PCR” (reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real mediante transcriptasa reversa).

Si bien es cierto, en Chile no existen notificaciones oficiales sobre la presencia de esta enfermedad, la vigilancia activa para PD sólo se ha realizado desde agosto del año 2008

(Valdés⁴, 2009, com. pers.). Todos aquellos cuadros sospechosos previos a esta fecha no han sido reconocidos de manera oficial. Si se piensa en la gran importación de ovas realizada por Chile, cuyo origen corresponde a los países salmicultores del hemisferio norte, como Noruega, Irlanda, Escocia, entre otros, donde la enfermedad tiene un impacto muy relevante, en términos tanto sanitarios como económicos, el riesgo de introducción del virus es considerable.

La zona sur de la Región de Los Lagos, pasó de ser una zona tradicionalmente agropecuaria a una acuícola, debido principalmente a las ventajas comparativas naturales; mano de obra semi-calificada abundante, con salarios bajos en comparación con la competencia; apoyo del sector público; y a su consolidación en los mercados internacionales con un producto de elevada calidad (Amtmann *et al.*, 2004). A la fecha se estima en más de 200 empresas las que forman parte del “cluster” del salmón (agrupación de empresas dedicadas a la salmicultura), de las cuales un 70% pertenecen a la X Región. Estas empresas corresponden a la totalidad de los actores de esta industria, tales como fabricación de jaulas para la piscicultura y cultivos, fabricación de redes, casas y bodegas flotantes, empresas de alimento para salmónes, laboratorios, entre otras. En este mismo sentido la Región de Los Lagos concentra cerca del 90% de la actividad salmonera del país (Montero *et al.*, 2001).

Frente a esta situación, el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) ha implementado un plan de vigilancia activa de los Alphavirus en salmónes de cultivo y además en peces silvestres, con el objetivo de determinar si éstos cumplen una función de reservorio. En este sentido, la Subsecretaría de Economía, Fomento y Reconstrucción licitó varios estudios para la detección de Alphavirus en distintos medios productivos y silvestres, entre los cuales ADL Diagnostic Chile Ltda. se adjudicó uno de ellos que tiene por objetivo determinar la presencia del virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV) en las poblaciones de peces silvestres y asilvestrados en la actual Región de Los Lagos (X Región), marco dentro del cual fue realizada esta memoria de título.

⁴ Pablo Valdés, MV. SERNAPESCA, Unidad de Acuicultura. Com. pers. Julio 2009.

3. HIPÓTESIS

El virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV) se encuentra presente en poblaciones de peces silvestres y asilvestrados en los lagos de la Región de Los Lagos (X Región) con concesiones de salmonicultura.

4. OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV) en la población de peces silvestres y asilvestrados en los lagos de la Región de Los Lagos (X Región) con concesiones de salmonicultura.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descripción de la población de peces de los lagos muestreados.
- Determinar la presencia del virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV) en peces silvestres y asilvestrados de los lagos en estudio.
- Conocer la proporción de individuos positivos al virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV) en peces silvestres y asilvestrados muestreados en los lagos en estudio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio epidemiológico

Se realizó un estudio epidemiológico para demostrar la presencia de un agente patógeno específico, que corresponden a ejemplos de estudios de pruebas de hipótesis (Cameron *et al.*, 2003). Para este tipo de estudios se requiere tener en consideración para el cálculo del tamaño de muestra, el nivel de confianza, la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica, el tamaño de la población y establecer una prevalencia mínima a detectar. Estos estudios no buscan probar la ausencia absoluta de una enfermedad o agente, por el contrario, buscan determinar la probabilidad de observar una determinada cantidad de individuos positivos a la prueba diagnóstica, basados en un muestreo aleatorio, con un tamaño de muestra n desde una población que está enferma a una prevalencia específica. Si la probabilidad es pequeña, se puede afirmar, con una confianza conocida, de que la enfermedad, en caso de estar presente en la población estudiada, presenta una prevalencia menor que la establecida para el cálculo de tamaño de muestra.

Unidad de Estudio

De acuerdo a lo establecido por los requerimientos técnicos del estudio, se analizaron peces silvestres (nativos) y asilvestrados (salmónidos) de 10 lagos de la X Región de Los Lagos (Imágenes 2 y 3), con concesiones de salmonicultura. Los lagos seleccionados son: Rupanco, Llanquihue y Chapo para la X Región continental y los lagos: Popetán, Tupuhueico, Cucao, Huillinco, Tarahuin, Natri y San Antonio para la X Región Insular, como se detalla en la Cuadro 3. La unidad de estudio a utilizar corresponde a cada pez analizado.

CUADRO 3. NÚMERO DE CONSESIONES SEGÚN AREA CONTINENTAL Ó INSULAR Y LAGOS CONSIDERADOS EN EL ESTUDIO. REGIÓN DE LOS LAGOS. 2009.

Lagos	N° de concesiones
Región de Lagos Continental	
Lago Rupanco	7
Lago Llanquihue	15
Lago Chapo	6
SUBTOTAL	28
Región de Los Lagos Insular	
Popetán	1
Tepuhueico	1
Cucao	1
Huillinco	5
Tarahuin	2
Natri	3
San Antonio	1
SUBTOTAL	14
TOTAL	42

IMAGEN 2. VISIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS LAGOS MUETREADOS EN LA X REGIÓN CONTINENTAL.



Región de los Lagos Continental

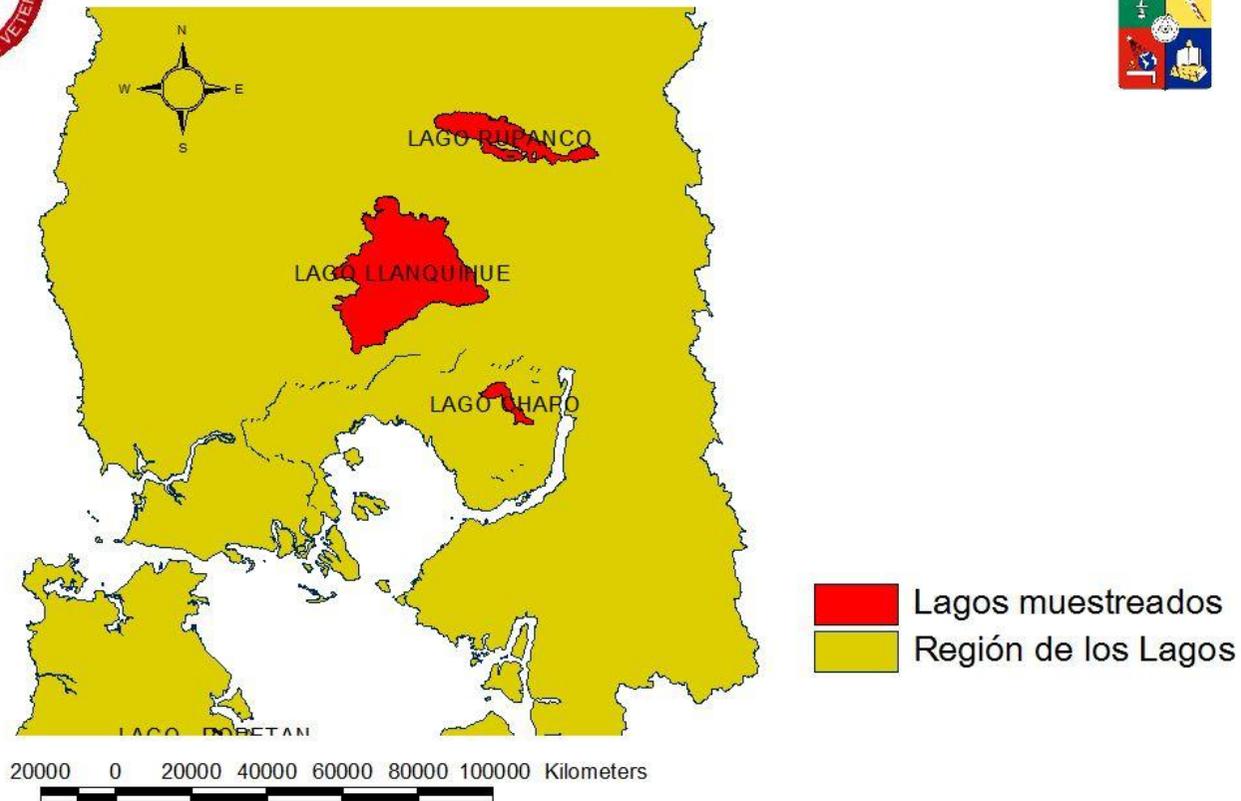
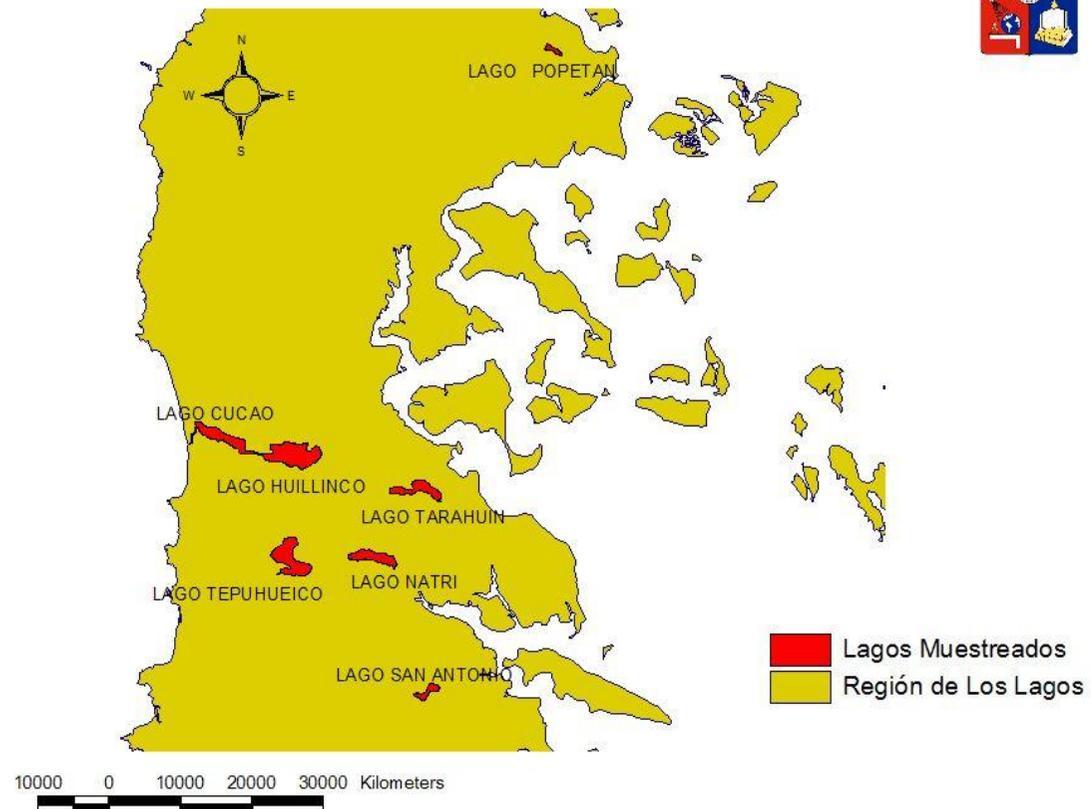




IMAGEN 3. VISION ESQUEMATICA DE LOS LAGOS MUESTREADOS EN LA X REGION INSULAR (CHILOÉ).



Región de los Lagos (Insular)



Tamaño de muestra

Debido a que el objetivo del presente estudio es detectar la presencia del virus de la enfermedad del páncreas en una población dada, y a que esta enfermedad no se encuentra descrita en el país, el muestreo debe estar orientado a la detección o confirmación de la ausencia de ésta. Para tener la certeza absoluta de que una enfermedad está o no presente en una población, la única forma es aplicar una prueba diagnóstica a la población completa, y asumir que la prueba aplicada es perfecta, esto es que tenga sensibilidad y especificidad máximas.

Debido a que un muestreo intensivo de toda la población de peces en un lago no es practicable y a que no existen pruebas perfectas, se debe proceder a realizar un muestreo. Este muestreo debe estar orientado a buscar la enfermedad en la población de peces, asumiendo que la enfermedad está presente a una prevalencia muy baja. Dohoo *et al.*, (2003), proponen establecer esta prevalencia mínima en 1%, asumiendo que por tratarse de una enfermedad infecciosa, debería haber una cantidad basal de individuos infectados. Basados en esta premisa, se puede obtener un tamaño de muestra requerido para estar seguros de detectar una enfermedad, si su prevalencia fuera mayor o igual a 1%.

Con este fin y dado que se muestrean poblaciones infinitas (> 1000 animales), se utilizó la siguiente fórmula (Dohoo *et al.*, 2003):

$$n = \ln \alpha / \ln q.$$

Donde n = tamaño de muestra requerido, α = usualmente fijada en 0,05 o 0,01 (relacionado con el nivel de confianza utilizado, 95% o 99%), q = (1- prevalencia mínima esperada).

De acuerdo a esta fórmula, considerando un total desconocimiento del tamaño de la población en cada unidad de estudio y estimando un 1% como nivel mínimo de prevalencia de PD (95% de confianza), el tamaño de muestra que garantiza un nivel mínimo de representatividad sería de 297 peces por lago, considerando independencia del tamaño de éstos y su especie, así como del tiempo requerido para la colección de las muestras. Previamente a la recolección de los ejemplares a estudiar, se solicitaron los respectivos permisos de pesca de investigación a la Subsecretaría de Pesca, autoridad competente.

Selección de la muestra

Dado que el objetivo del presente estudio es detectar la presencia del virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV) en poblaciones de salmónidos silvestres y asilvestrados, el diseño del muestreo debe estar direccionado a aquellos individuos en que sería más probable encontrar al agente pesquisado, método denominado muestreo dirigido. Este tipo de muestreo difiere del muestreo tradicional para medir, por ejemplo, la prevalencia de una enfermedad en que debe ser obtenida aleatoriamente (muestreo probabilístico). Por ésto el diseño del muestreo fue no probabilístico deliberado o intencional, el cual consiste en seleccionar la muestra de forma dirigida hacia la búsqueda de los individuos que son de interés particular en el estudio (p. e. individuos enfermos); de esta manera se determina, según los objetivos del estudio, aquellos elementos que integrarán la muestra.

De esta manera, se establecieron entre 3 y 6 estaciones de muestreo por lago (cada una de las cuales fue referenciada geográficamente) dependiendo del tamaño del mismo, el nivel cuantitativo de operaciones acuícolas y su ubicación espacial. La dirigibilidad del muestreo se orientó a pesquisar individuos enfermos o en su defecto, infectados con Alphavirus, en estaciones de muestreo consideradas asociadas a factores biológicos y ambientales de los peces y cuerpos de agua, tales como, la cercanía a centros de producción de salmonídeos, inmediaciones de desembocaduras de ríos o arroyos asociados con pisciculturas en tierra, inmediaciones de la desembocadura del cuerpo de agua de los lagos propiamente tal e inmediaciones de sectores sometidos a aporte de niveles mayores de materia orgánica (villorrios o asentamientos humanos con descargas de desechos directas al lago) (Imagen 4). Se trató de pesquisar a los individuos enfermos en aquellas estaciones de muestreo más alejadas de las instalaciones de las concesiones para salmonicultura ya que al competir por el alimento aquellos individuos aparentemente sanos tendrán más posibilidades de acceder a éste ubicándose en las cercanías de las concesiones operativas, mientras que los individuos enfermos se encontraran distantes a estos puntos.

Muestreo

Se consideró la realización de un muestreo único de 297 individuos por lago, el que podrá repetirse al final del estudio, en el caso específico de que no se alcance el tamaño muestral estipulado precedentemente. La operación de pesca se desarrolló mediante redes de enmalle fijas y de distintos calibres para posibilitar la captura de individuos de distintos tamaños.

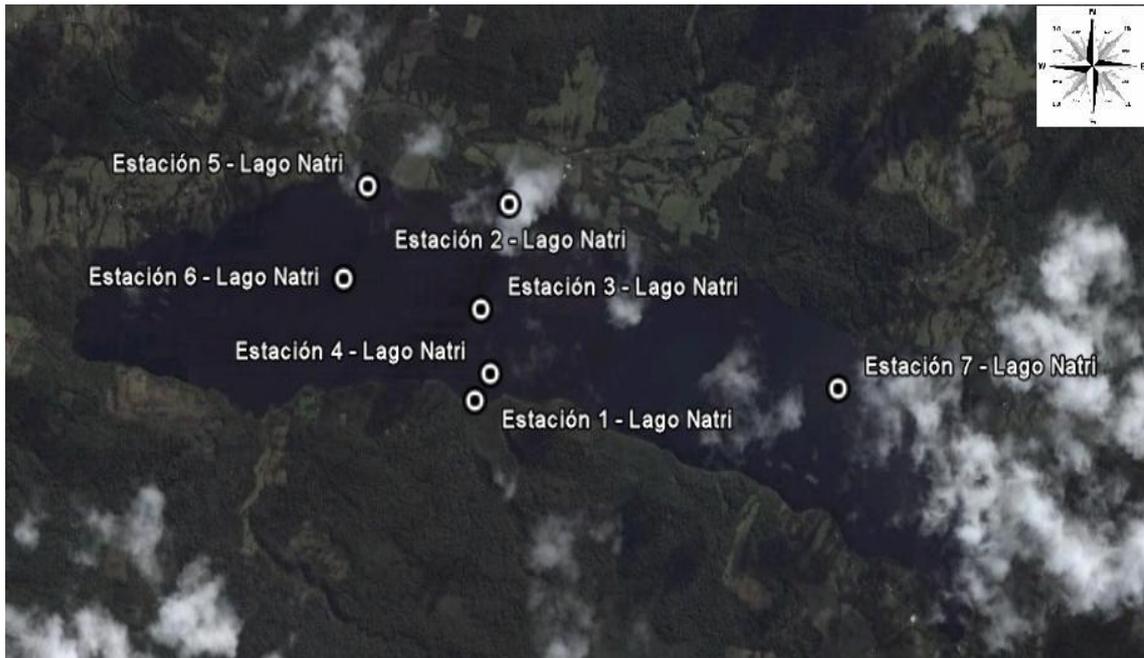


IMAGEN 4. Imagen satelital del Lago Natri con sus estaciones de muestreo. Estaciones 2, 3 y 7 cercanas a centros de producción. Estaciones 1 y 5 asociadas a desembocaduras de ríos o arroyos. Estaciones 4 y 6 ubicadas al azar en el lago.

Se registró la especie del pez con el objeto de estimar diferencias en la proporción de positivos entre las especies capturadas. Adicionalmente, en cada estación de muestreo se midieron variables como temperatura del agua, transparencia, conductividad y pH, como también profundidad de los cuerpos de agua. La salinidad total se estimó mediante fórmulas empíricas a partir de la conductividad.

Los peces muestreados fueron distribuidos entre las distintas estaciones de muestreo definidas según lago. Luego, se procedió a la eutanasia de los ejemplares mediante sobredosis de anestesia (Benzocaína) y se realizó un examen anatomopatológico (necropsia). Se registraron los principales hallazgos patológicos, además del sexo del espécimen, madurez relativa y contenido estomacal.

Finalmente, desde cada pez, se recolectaron muestras de corazón, branquias, riñón, hígado y páncreas, las que de ser necesario, se depositaron en RNA-Later para su conservación y transporte hasta el laboratorio. Para aquellas muestras en que se demoró su procesamiento, se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar las extracciones del material genético. A partir de estas muestras, se conformaron “pools” de tres individuos cada uno, los que, de ser positivos, se analizarían de

manera individual. De la misma manera, se colectaron y almacenaron contra-muestras de tejidos para eventuales análisis posteriores. Así, se conformaron y analizaron un total de 99 “pooles” por lago, salvo para los lagos Natri, San Antonio, Tepuhueico y Popetán en que se conformaron y analizaron 77, 6, 14 y 13 “pooles” respectivamente.

Análisis de laboratorio

A.- Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa mediante Transcriptasa Reversa en Tiempo Real (qRT-PCR). Las muestras se prepararon para análisis mediante qRT-PCR Taqman®, específico para Alphavirus de acuerdo al método indicado por Hodneland y Endresen, (2006). El RNA viral fue extraído utilizando el kit de extracción E.Z.N.A.® (Omega-Biotek, USA), y una vez obtenido el templado o DNA complementario (cDNA), se amplificaron utilizando partidores específicos que amplifican un sector del gen nsP1 que codifica para la proteína no estructural P1 y que permite la detección de los tres subtipos de Alphavirus (“Upstream”- CCGGCCCTGAACCAGTT y “Downstream” - GTAGCCAAGTGGGAGAAAGCT), con los que se debiera obtener un producto de amplificación de 107 pares de bases.

B.- Secuenciamiento genético. En caso de resultados RT-PCR positivos, la presencia de SPDV se confirmó mediante secuenciamiento genético de los productos PCR amplificados y analizados en ABI PRISM 310 DNA Analyzer (Applied Biosystem, USA). Finalmente, las reacciones de secuenciamiento fueron chequeadas por errores de cromatografía con el Sequence Scanner v1.0 Software (Applied Biosystems, USA). ADL Diagnostic Chile cuenta con el secuenciador y presta servicios de secuenciamiento en la industria del salmón.

Para asegurar el correcto funcionamiento de la prueba diagnóstica se realizó un control positivo mediante el análisis de tejido renal de salmón del Atlántico infectado experimentalmente con cDNA de SPDV. Junto con esto se realizó un “Ring Test” con la colaboración del Dr. David Graham del laboratorio del Agri-Food and Biosciences Institute (AFBI) (Sandoval⁵, 2010, com. pers.).

Se construyó una base de datos en MS Excel con todos los resultados de los análisis qRT-PCR de los individuos muestreados, distribuidos según lago, sector del mismo, especie, etc.

⁵ Álvaro Sandoval, MV. ADL DIAGNOSTIC CHILE. Com. pers. Marzo 2010.

Restricciones

El Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) estableció una restricción sobre la cuota de extracción de especies nativas, determinando un máximo de extracción de 5 individuos por lago, independiente de su especie.

6. RESULTADOS

6.1 Descripción de la población de peces presente en los lagos muestreados.

De acuerdo al diseño del estudio se estableció como tamaño de muestra por lago, la captura de 297 individuos. Dicho tamaño de muestra se logró cumplir en seis de los diez lagos (Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuín, Huillinco y Cucao) que forman parte de esta memoria. De los cuatro restantes, en el lago Natri se capturaron 229 peces (77%), sin embargo, en los tres lagos restantes (San Antonio, Tepuhueico, Popetán) no se logró cumplir con una muestra superior a un 15% del tamaño establecido y por lo tanto entrega un panorama muy parcial de las especies que habitan en estos lagos. El total de peces muestreados fue de 2.098 (71% de la cantidad establecida por el diseño del estudio, correspondiente a 2.970 peces). En la Cuadro 4 se presenta un detalle de la cantidad y especie capturada por lago. Entre las especies salmonídeas encontradas destacan: trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), salmón del atlántico (*Salmo salar*), trucha fario (*Salmo trutta*), trucha criolla (*Percichthys trucha*). Entre las especies nativas encontradas destacan: pejerrey (*Basilichthys* sp.), peladillas (*Aplochiton* sp.) (de las cuales se lograron identificar específicamente dos especies *Aplochiton zebra* y *Aplochiton taeniatus*), róbalo (*Eleginops maclovinus*), cabrilla común (*Paralabrax humeralis*) y sardina (*Sardina pilchardus*); donde 2056 individuos (98%) corresponden a especies salmónidas introducidas y sólo 42 (2%) correspondientes a especies nativas de los lagos del sur de Chile.

CUADRO 4. NÚMERO DE PECES CAPTURADOS POR ESPECIE, SEGÚN LAGO. REGIÓN DE LOS LAGOS. 2009

Lago	Número total de peces capturados	Especies									
		Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Trucha fario (<i>Salmo trutta</i>)	Trucha criolla (<i>Percichthys trucha</i>)	Pejerrey (<i>Basilichthys</i> sp)	Peladilla (<i>Aplochiton</i> sp)	Róbalo (<i>Eleginops maclovinus</i>)	Cabrilla común (<i>Paralabrax humeralis</i>)	Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)
Chapo	297	264	32	0	-	1	-	-	-	-	-
Rupanco	297	197	91	4	-	1	4	-	-	-	-
Llanquihue	297	171	103	17	1	1	3	1	-	-	-
Tarahuín	297	241	51	-	-	1	4	-	-	-	-
Huillinco	297	291	1	-	-	-	1	1	1	1	1
Cucao	297	291	-	1	-	-	2	2	1	-	-
Natri	229	14	210	-	-	-	-	5	-	-	-
Sn. Antonio	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tepuhueico	42	37	-	-	-	-	-	5	-	-	-
Popetán	39	34	-	-	-	-	-	5	-	-	-
TOTAL	2.098	1.546	488	22	1	4	14	19	2	1	1

El registro del sexo y etapa de desarrollo quedan representados en el Cuadro 5, en que se puede observar que 1.008 de los individuos muestreados corresponde a machos (48%), mientras los restantes 1.090 (52%) a hembras. Tendencia que se mantiene en cinco de los diez lagos muestreados (Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuin, Cucao), para el lago Huillinco la proporción difiere al presentarse una proporción de machos de un 38,7% (Gráfico 1). Los lagos Natri, San Antonio, Tepuhueico y Popetán no siguen la tendencia, pero su situación es especial al no obtenerse un tamaño de muestra adecuado. De los individuos muestreados sólo 170 (8,1%) se encuentran en etapa reproductiva, mientras que el resto de la población (1928 individuos, equivalente al 91,9%) corresponde a ejemplares juveniles o adultos fuera del período reproductivo (Gráfico 2).

CUADRO 5. PORCENTAJE DE PECES POR SEXO Y ETAPA DE DESARROLLO, SEGÚN LAGO. REGIÓN DE LOS LAGOS. 2009.

Lago	Sexo				Etapa de desarrollo			
	macho	%	hembra	%	juvenil/ adulto	%	Reprod.	%
Chapo	149	50,2	148	49,8	297	100,0	0	0,0
Rupanco	137	46,1	160	53,9	219	73,7	78	26,3
Llanquihue	174	58,6	123	41,4	296	99,7	1	0,3
Tarahuin	135	45,5	162	54,5	296	99,7	1	0,3
Huillinco	115	38,7	182	61,3	297	100,0	0	0,0
Cucao	128	43,1	169	56,9	297	100,0	0	0,0
Natri	143	62,4	86	37,6	188	82,1	41	17,9
San Antonio	4	66,7	2	33,3	2	33,3	4	66,7
Tepuhueico	9	21,4	33	78,6	11	26,2	31	73,8
Popetán	14	35,9	25	64,1	25	64,1	14	35,9
TOTAL	1.008	48,0	1.090	52,0	1.928	91,9	170	8,1

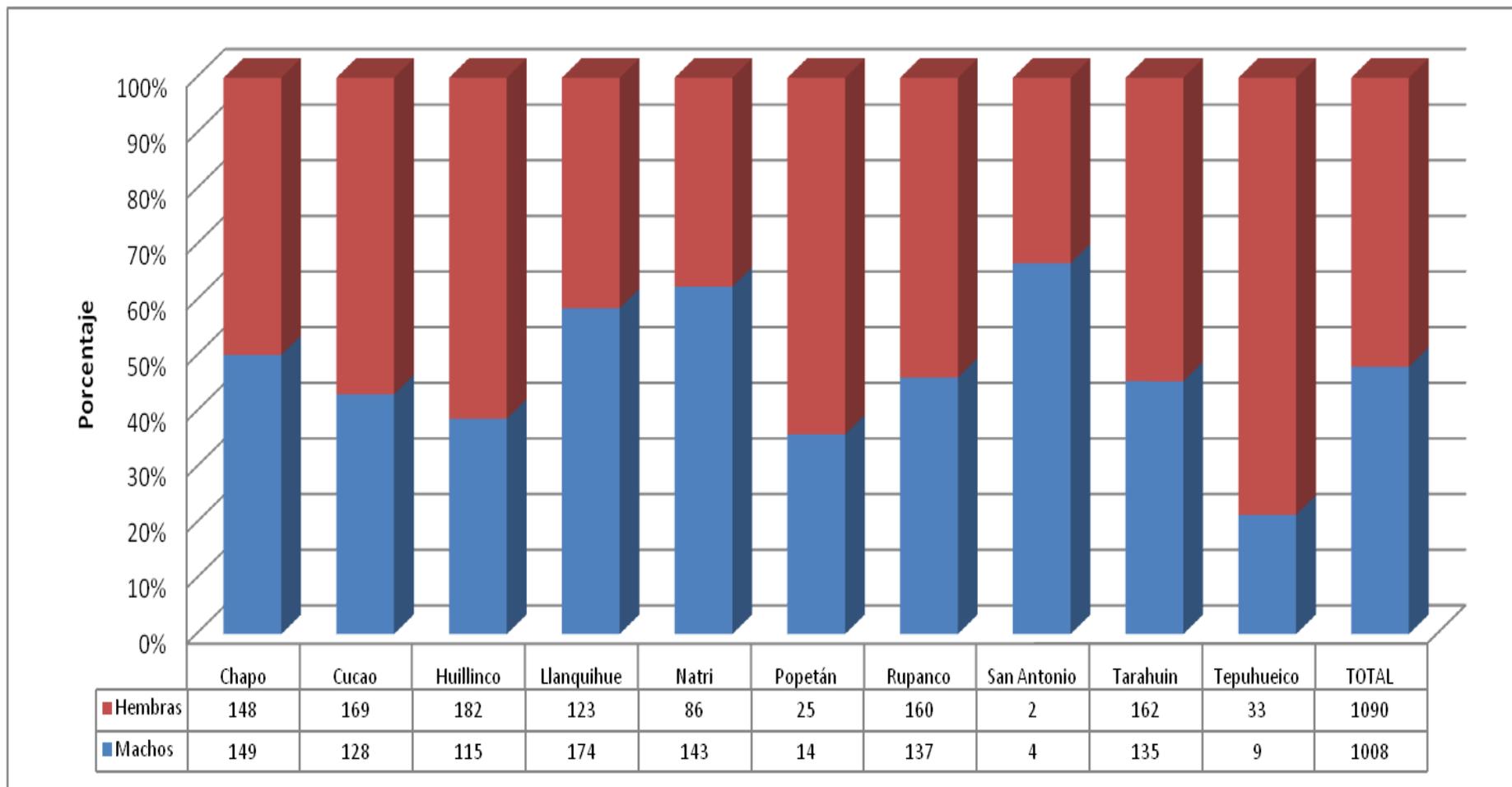


GRÁFICO 1. PORCENTAJE DE PECES POR SEXO, SEGÚN LAGO. REGIÓN DE LOS LAGOS. 2009.

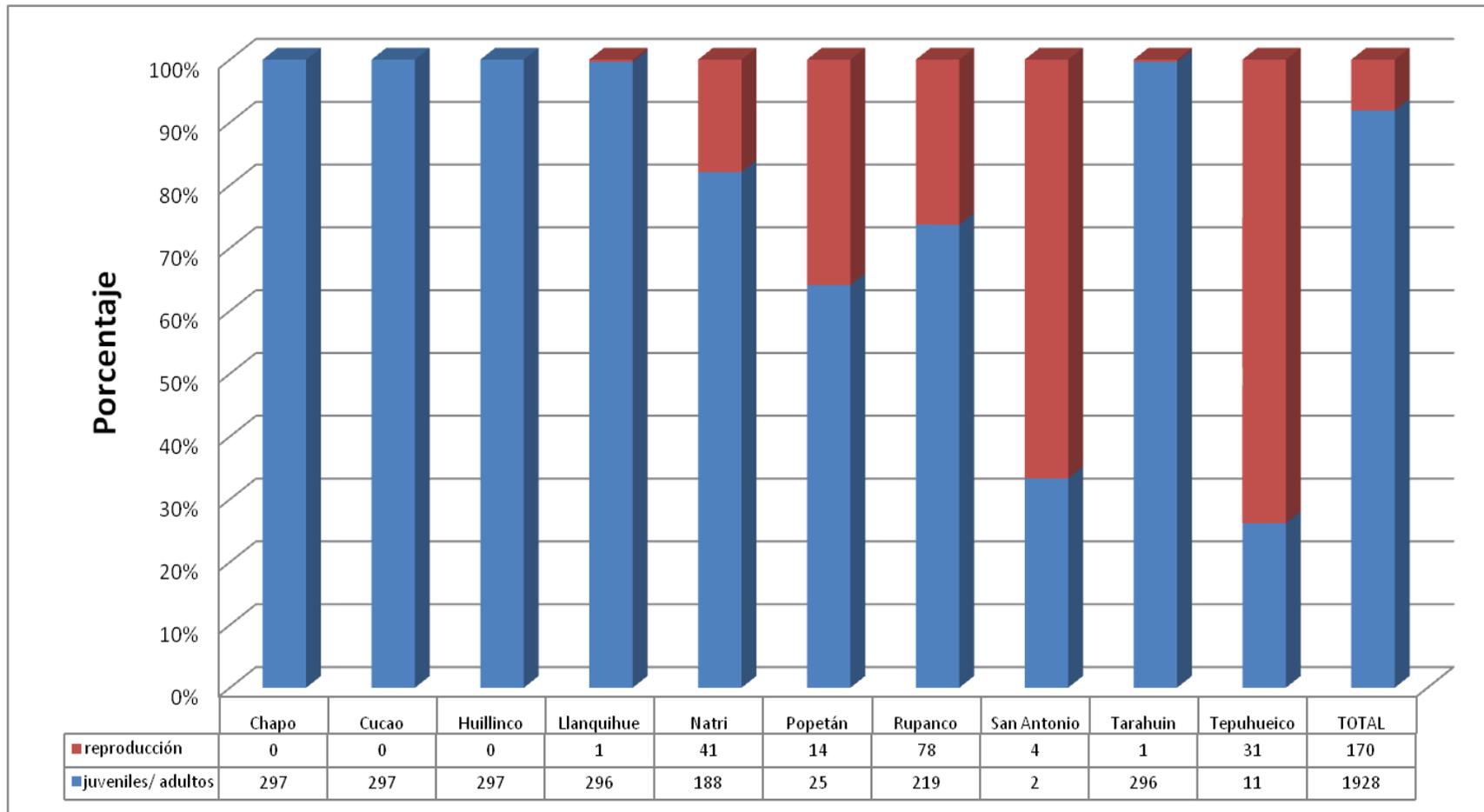


GRÁFICO 2. PORCENTAJE DE PECES POR ETAPA DE DESARROLLO, SEGÚN LAGO. REGIÓN DE LOS LAGOS. 2009.

6.2 Determinar la presencia del virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV) en peces silvestres y asilvestrados de los lagos en estudio.

Se analizaron, mediante “real time” rt-PCR Taqman®, un total de 707 “pooles” correspondientes a los 2.098 individuos muestreados, en la totalidad de los lagos de los cuales ninguno resultó ser positivo a SAV, independiente de la especie que fuese objeto de análisis. En aquellos lagos en que se alcanzó el tamaño de muestra de 297 individuos (Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuín, Huillinco, Cucao) se puede afirmar, con un 95% de confianza, que el virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV, SAV) de estar presente se encontraría en una prevalencia menor al 1% determinada como corte en el estudio, o que probablemente el agente no se encuentra presente en la población de salmónidos silvestres o asilvestrados de los lagos mencionados (Cameron *et al.*, 2003). Para el resto de los lagos (Natri, San Antonio, Tepuhueico y Popetán), si bien es cierto, los análisis arrojaron los mismos resultados, es decir, no hubo ningún resultado positivo, en estos lagos no se alcanzó el tamaño crítico de muestra y, por lo tanto, no se puede concluir que el virus no se encuentre presente bajo las condiciones determinadas por el estudio (Cuadro 6).

CUADRO 6. NÚMERO DE “POOLES” ANALISADOS MEDIANTE rRT-PCR SAV, SEGÚN LAGO. REGIÓN DE LOS LAGOS. 2009.

Lago	Número de peces capturados	Número de “pooles” analizados	SAV	
			Positivos	Negativos
Chapo	297	99	0	99
Rupanco	297	99	0	99
Llanquihue	297	99	0	99
Tarahuín	297	99	0	99
Huillinco	297	99	0	99
Cucao	297	99	0	99
Natri	229	77	0	77
San Antonio	6	6	0	6
Tepuhueico	42	14	0	14
Popetán	39	13	0	13

6.3 Conocer la proporción de individuos positivos al virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV) en peces silvestres y asilvestrados muestreados en los lagos en estudio.

Como se expresa en el cuadro 6, la proporción de positividad de SPDV para los peces muestreados en los lagos Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuín, Huillinco y Cucao corresponde a un 0%, al no detectarse ningún individuo que resultara positivo a SAV mediante la técnica diagnóstica seleccionada, por lo tanto se puede concluir que en estos lagos dicha proporción del virus podría ser menor al 1% o que el agente no se encuentra presente en estos (Cameron *et al.*, 2003). Para el caso de los lagos Natri, San Antonio, Tepuhueico y Popetán, no es posible afirmar o justificar tal resultado ya que no se logró cumplir con el tamaño de muestra para realizar esta afirmación (Cameron *et al.*, 2003). Por lo tanto, se puede afirmar que sólo las muestras obtenidas de estos lagos poseen una proporción de positivos de 0%.

7. DISCUSIÓN

7.1 Descripción de la población de peces presente en los lagos muestreados.

Para los lagos Natri, San Antonio, Tepuhueico y Popetán no se logró cumplir con el tamaño de muestra establecido por el estudio (297 individuos), esto puede ser indicador de que en estos lagos la población de peces es menor en comparación a aquellos lagos en que si se pudo cumplir con el tamaño de muestra, esta situación se expresa en una mayor dificultad para capturar a estos individuos. Una explicación para este escenario se relaciona con la menor disponibilidad de alimento, al tratarse de lagos con menos concesiones para la salmonicultura y muchas de ellas sin operatividad por periodos de hasta 8 años, dificultando la obtención del tamaño de muestra establecido para este estudio y afectando a la caracterización de las poblaciones de peces presentes en estos lagos. Junto con esto, la fecha de realización del muestreo coincide con una etapa de baja actividad reproductiva y que puede ir de la mano con la presencia de poblaciones de peces más pequeñas y de menor tamaño ya que se encuentran realizando su crecimiento en el mar (Fleming, 1996; Fleming, 2004).

La conducta reproductiva de los salmónidos indica que éstos realizan su fase de crecimiento en agua salada para retornar a los ríos o lagos donde nacieron, y, por lo tanto, la reproducción ocurre en agua dulce. Los salmónidos en vida silvestre, presentan su periodo reproductivo centrado principalmente a fines de primavera e inicios de verano (Fleming, 1996; Fleming, 2004), esto concuerda y explica los resultados expuestos en el Cuadro 5, datos que coinciden con el periodo en que fue realizado el muestreo, fines de Otoño e Invierno, en que la principal etapa de desarrollo de las especies capturadas corresponde a especies salmonídeas juveniles y adultas sin desarrollo reproductivo completo, debido a que la temperatura del agua es más baja y por lo tanto la reproducción no ocurre (McLoughlin *et al.*, 2003).

La restricción establecida por SERNAPESCA para la captura de especies nativas no permite realizar una descripción detallada sobre las características de la población de estas especies presentes en los lagos muestreados y su posible interacción con las especies asilvestradas.

7.2 Determinar la presencia del virus de la Enfermedad del Páncreas del Salmón (SPDV) en peces silvestres y asilvestrados de los lagos en estudio.

Si bien no se alcanzó el tamaño de muestra requerido en la totalidad de lagos incorporados en este estudio, aquellos lagos en que si se logró presentan la mayor concentración de concesiones en operación y podría estar reflejando una situación global del estatus sanitario de los lagos de la X Región.

Como antecedente, habitualmente se considera como exitoso, desde el punto de vista sanitario, a un estudio cuando todos los individuos analizados se encuentran libres de la enfermedad o del agente y se considera exitoso desde su diseño cuando el tamaño de muestra calculado se ha alcanzado. Por este motivo es importante no sobre-estimar o sub-estimar el tamaño muestral, ya que se producen problemas económicos, sanitarios e incluso políticos (Schwermer *et al.*, 2009). De manera adicional, ningún estudio es capaz de garantizar que una población se encuentre libre de una enfermedad, ya que es posible que al trabajar con muestras, aquellos animales que presentan el agente no sean seleccionados para su análisis, incluso si estudiáramos a toda la población, dada la naturaleza imperfecta de las pruebas diagnósticas, y dependiendo de la sensibilidad de la prueba seleccionada, se podría caracterizar a un individuo infectado como sano (falso negativo) con el consecuente impacto sanitario y económico mencionado previamente.

Aquellos estudios que presentan como objetivo probar la ausencia de un agente patógeno en una población, no buscan probar la ausencia absoluta de una enfermedad o agente, por el contrario, buscan determinar la probabilidad de observar una determinada cantidad de individuos positivos a la prueba diagnóstica seleccionada; usualmente este tipo de estudios son aceptados como evidencia para concluir la ausencia de una enfermedad o agente patógeno. Estos estudios presentan como requerimiento la estimación de un tamaño de muestra que permita afirmar la ausencia del agente pesquisado, es por ésto que habitualmente se requiere de muchas muestras, ya que se debe tener certeza absoluta respecto al estatus sanitario de la población estudiada y, por lo tanto, se hace necesario contar, como elementos básicos para la estimación de tamaño de muestra, con: el nivel de confianza a utilizar, la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica, el tamaño de la población, establecer una prevalencia mínima a detectar y la probabilidad de concluir erróneamente la presencia de la enfermedad cuando esta no se encuentra (Cameron *et al.*, 2003; Dohoo *et al.*, 2003; Thrusfield, 2005). Para el apoyo a los resultados, su

análisis e interpretación es adecuado contar con contramuestras que permitan verificar la positividad o negatividad de un “pool” de individuos (Salman, 2003).

Para este estudio en particular no es posible tener una estimación precisa respecto del tamaño de la población de peces que está presente en cada lago estudiado, ya que al tratarse de especies silvestres o asilvestradas, no es posible conocer su dinámica poblacional, pero es poco probable que estas poblaciones sean menores a 1000 individuos (determinado como punto de corte para diferenciar una población finita de una infinita para el cálculo de tamaño de muestra) según Dohoo *et al.*, (2003). Sin embargo el método seleccionado para estimar el tamaño de muestra no incorpora el tamaño de la población, ya que en el ámbito veterinario se suele trabajar con poblaciones muy grandes o con esta misma situación de desconocimiento de las dinámicas poblacionales de la fauna silvestre. Junto con esto, el tamaño de muestra se estabiliza mientras la población es más grande, es decir los resultados no arrojan diferencias significativas respecto a la cantidad de individuos a muestrear y de esta forma se utiliza un número elevado de tamaño de muestra para poblaciones silvestres de forma de no dejar pasar individuos potencialmente infectados.

Dentro de estos puntos a considerar para el diseño e implementación de este tipo de estudios, lo más importante es conocer la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica a utilizar (Thurmond, 2003), ya que ésto indicará la proporción de falsos positivos o negativos que sean resultado de un estudio, considerando como falso positivo a aquellos individuos que siendo negativos al agente pesquisado son considerados como positivos por la prueba diagnóstica y como falso negativo a aquellos individuos que estando realmente infectados no son considerados como tales por la prueba diagnóstica. Para este tipo de estudios el mayor impacto se presenta en la obtención de una elevada proporción de individuos falsos negativos ya que permitiría la permanencia del agente y su potencial diseminación, impidiendo el conocimiento real del estatus sanitario de la población estudiada, con el consiguiente impacto político, económico y sanitario al reconocer una zona como libre de un agente cuando éste realmente se encuentra presente (Cameron *et al.*, 2003; Thrusfield, 2005). A la fecha no se encuentra disponible información precisa sobre las variables (sensibilidad y especificidad) del método diagnóstico “real time” rt-PCR Taqman® en el diagnóstico de Alphavirus. Sin embargo rt-PCR se describe como una metodología altamente sensible, describiéndose como prueba de oro para el diagnóstico de patologías de origen viral, así como altamente específica. Existe evidencia de laboratorio que indica que no pierde su sensibilidad incluso trabajando con “pooles”

compuestos por hasta 12 individuos (Graham⁶, 2009, com. pers.). Esta metodología fue descrita por Hodneland y Endresen, 2006 como de referencia para su uso en el diagnóstico de esta enfermedad (PD), y en la actualidad el National Veterinary Institute de Noruega lo establece como prueba estándar para el diagnóstico del agente en los brotes ocurridos en este país. Gran parte de los países del hemisferio norte que presentan una fuerte industria salmonera utilizan este método diagnóstico.

La decisión de utilizar “pooles” de muestras pasa por la dificultad de procesar a cada uno de los individuos, ya que ésto requiere mucho tiempo y podría afectar la integridad de los tejidos muestreados, de esta forma se disminuye la infraestructura a utilizar, se gana tiempo y espacio (Cameron *et al.*, 2003). Como se debió considerar, para el cálculo de tamaño de muestra, que la prueba diagnóstica era perfecta (Sensibilidad y especificidad 100%) este tamaño de muestra se encuentra subestimado, ya que al disminuir la sensibilidad o especificidad de la prueba el tamaño de muestra debe incrementar. Esta situación da pie a la posibilidad de que algún individuo infectado con el agente no fuese muestreado.

Thrusfield (2005) considera una serie de parámetros de ingreso para realizar el cálculo:

- prevalencia mínima esperada, si la enfermedad estuviese presente.
- la probabilidad de detectar la enfermedad con la prevalencia mínima determinada.
- la probabilidad de concluir erróneamente la presencia de la enfermedad, cuando esta no se encuentra.
- el tamaño de la población.

Como resultado se obtienen dos valores:

- el número de animales a muestrear.
- un número de corte para animales positivos que pueden ocurrir en la muestra, que permite inferir que la enfermedad está ausente en la prevalencia especificada (asumiendo que estos resultados positivos corresponden a falsos positivos producto de una especificidad menor al 100%).

La restricción sobre la captura de especies nativas, impuestas por SERNAPESCA limita el conocimiento real sobre el estatus sanitario de los lagos muestreados e incluso impide determinar el rol de las especies silvestres en la transmisión de SAV, ya que al obtener negatividad en los individuos capturados, no indica que las especies

⁶ David A. Graham. MD. División de Ciencias Veterinarias, Instituto Agri-Food and Biosciences de Irlanda del Norte, Stormont, Belfast, Irlanda del Norte. Com. pers. Octubre 2009.

silvestres no puedan infectarse con el agente o desarrollar la enfermedad (Ruane *et al.*, 2008), importante para establecer patrones espaciales, temporales o espacio-temporales con la finalidad de reestructurar y facilitar la vigilancia futura de estas poblaciones o determinar el impacto ecológico y sanitario de la introducción de una nueva concesión a un lago. De la misma forma estas situaciones dificultan el proceso de muestreo en sí mismo, ya que obliga a una revisión más periódica de la redes para liberar a aquellos individuos nativos (Salman, 2003).

Cameron *et al.*, (1998), desarrollan un método más realista de enfrentarse no sólo al cálculo de tamaño de muestra, sino que también de enfrentar una vigilancia para confirmar la presencia o ausencia de un agente patógeno, entendiendo como ausencia de una enfermedad a la ausencia de evidencia clínica, epidemiológica o de otro tipo sobre la presencia de un agente infeccioso en un período de tiempo y una región determinada. De esta manera, se le otorga importancia a tres factores principales, indicadores de riesgo, información histórica y nivel de confianza, entendiendo el nivel de confianza con una interpretación más amplia que en los acercamientos tradicionales, haciendo referencia a la confianza de que un país se encuentre libre de una enfermedad determinada, relacionado a un estudio con propiedades específicas y que presenta información adicional. Uno de los objetivos que busca este método consiste en reducir el tamaño de muestra a utilizar, de manera consecutiva en el tiempo, considerando una evaluación de los riesgos, ya sea por movimientos poblacionales o por el riesgo de introducción del agente en cuestión, y un ajuste por valores temporales, basados en la historia de análisis realizados, en que el tamaño de muestra de estudios anuales se puede llegar a reducir hasta en un 25% en comparación con los métodos tradicionales. A su vez, se realiza una incorporación del riesgo de presentar un agente específico dentro del diseño de un estudio, ya que no todos los lagos presentan la misma probabilidad de contraer la infección, por ejemplo en aquellos lagos en que las concesiones para salmonicultura no se encuentran operativas por 8 años no presentan la misma probabilidad que aquellos lagos en que si se encuentran operativas, o aquellos lagos que presentan más concesiones operativas en comparación con otros y, por lo tanto, se puede dirigir el muestreo hacia estos lagos, aumentando la probabilidad de detectar el agente pesquisado, si éste estuviese presente y determinar un tamaño de muestra que facilite la realización efectiva del estudio y que permita incorporar una mayor cantidad de individuos de las especies nativas (Cameron y Baldock, 1998 ; Schwermer *et al.*, 2009).

Dadas las características y la envergadura de la investigación no fue posible la realización del muestreo en una sola etapa y por lo tanto los resultados se podrían ver influenciados por un aspecto temporal. Existen claras evidencias en relación a la época del año en que es más probable la ocurrencia de un brote de PD, Ruane *et al.*, (2008) analizaron este tópico en detalle, con registros de brotes de la enfermedad entre 2005 y el 2008 en Irlanda, confirmando que las épocas en que la ocurrencia de brotes es mayor corresponden a inicios del verano y fines de verano / inicio de otoño, siendo la explicación más probable la temperatura del agua; se observa que el rango entre los 10° C y los 15°C se presenta como el más adecuado para el desarrollo de la enfermedad, siendo este mismo espectro de temperatura el óptimo para su desarrollo en cultivos celulares (Ruane *et al.*,2005; Ruane *et al.*, 2008). Esta situación no fue coincidente con la realización del estudio, si bien éste se inició a mediados de otoño no se finalizó hasta muy adentrado el invierno, siendo muestreados lagos con un rango de temperatura que va desde los 6,6°C hasta los 15,8°C (Cuadro 7), haciendo posible que algunos lagos fueran muestreados en el momento en que la carga viral fuese demasiado baja para ser detectada por la técnica diagnóstica seleccionada. La variabilidad de las temperaturas en los lagos muestreados se explica por la duración del estudio. Los primeros lagos muestreados corresponden aquéllos ubicados en la X Región Continental; éstos fueron muestreados a mediados de otoño a diferencia de los lagos ubicados en la X Región Insular que se muestrearon en invierno.

Es importante tener en consideración la posibilidad de que el genoma de las cepas nacionales de SPDV presente diferencias mayores con las cepas detectadas a la fecha en el hemisferio norte y que, por lo tanto, no se hace posible su diagnóstico con la técnica utilizada en esta memoria.

CUADRO 7. REGISTRO DE VARIABLES AMBIENTALES, SEGÚN LAGO. REGIÓN DE LOS LAGOS. 2009.

Lago	Temperatura (C°)	OD (%)	OD (ppm)	Salinidad (psu)	pH	Conductividad (us/cm)	Turbidez (m)	Sólidos totales (ppm)
Chapo	13,3 – 15,0	63,8 – 88,5	7,0 – 9,8	0,0 – 0,01	5,7 – 7,2	11,0 – 25,0	6,5 – 8,0	6,0 – 12,0
Rupanco	14,7 – 15,8	86,0 – 101,0	8,7 – 10,1	0,02	5,9 – 7,1	36,0 – 50,0	12	18,0 – 27,0
Llanquihue	13,7 – 14,2	94,5 – 106,7	9,8 – 10,9	0,04 – 0,05	5,2 – 6,6	77,0 – 98,0	ND	38,0 – 41,0
Huillinco	9,1 – 10,5	82,6 – 91,2	9,1 – 11,2	0,75 – 1,60	5,8 – 7,7	1477,0 – 3001,0	2,0 – 2,5	816 – 1501
Cucao	9,7 – 10,1	89,2 – 102,3	10,9 – 11,4	1,53 – 2,01	6,0 – 7,2	2890,0 – 3100,0	1,5	1526 – 1628
Tarahuin	10,0 – 12,2	72,0 – 94,0	8,1 – 9,9	0,01 – 0,02	5,8 – 6,7	28,0 – 59,0	2,5 – 3,0	14,0 – 29,0
Natri	9,8 – 10,3	68,6 – 77,5	7,7 – 9,3	0,02	6,5 – 7,1	36,0 – 54,0	4,0	18,0 – 27,0
San Antonio	7,2 – 7,7	62,0 – 63,0	7,5 – 7,7	0,01	6,7 – 7,2	12,0 – 33,0	ND	6,0 – 16,0
Tepuhueico	6,6 – 8,5	59,1 – 74,7	7,0 – 8,7	0,01 – 0,02	5,9 – 6,4	19,0 – 57,0	2,0	10,0 – 29,0
Popetán	7,8 – 8,2	89,4 – 103,1	8,8 – 12,0	0,01 – 0,03	5,6 – 6,0	14,0 – 69,0	1,5	7,0 – 35,0

OD: Oxígeno disponible.

ND: No determinada.

Los estudios para comprobar la ausencia de un agente patógeno específico, como el realizado en esta memoria, al no estimar prevalencia, no requieren que el muestreo se realice de manera aleatoria; es más, el realizar un muestreo dirigido incrementa la probabilidad de detectar el agente pesquisado (Dohoo *et al.*, 2003). Junto con esto, el tipo de estrategia de muestreo (muestreo dirigido) no permitiría el cálculo correcto de la prevalencia, al encontrarse ésta sobre-estimada en la muestra obtenida (Dohoo *et al.*, 2003). En el caso de los estudios prevalenciales la muestra debe obtenerse de manera aleatoria, ya que es la única forma de realizar una estimación representativa de una población (Thrusfield, 2005). Para el presente estudio se hace difícil realizar un muestreo dirigido sobre poblaciones silvestres, ya que no se puede determinar *a priori* qué individuos se encuentran enfermos y qué individuos no expresan signos de enfermedad, existiendo la posibilidad de que aquellos individuos que se encuentran infectados no sean capturados (Cameron, 2002).

8. CONCLUSIONES

- De acuerdo al diseño del estudio, en aquellos lagos en que se alcanzó el tamaño crítico de muestra de 297 individuos (Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuín, Huillinco, Cucao) se concluye, con un 95% de confianza que el virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV, SAV) no se encuentra presente en la población de salmónidos silvestres o asilvestrados, o que presentaría una prevalencia menor al 1% determinada como corte en el estudio, asumiendo que la prueba diagnóstica presentaba una sensibilidad y especificidad de un 100%. Para el resto de los lagos (Natri, San Antonio, Tepuhueico y Popetán), no se puede concluir que el virus no se encuentre presente bajo las condiciones determinadas por el estudio. La situación particular del lago Natri, en que se obtuvo una muestra de un 77% (229 individuos) de lo establecido por el diseño, no se puede afirmar la ausencia de la enfermedad.
- De acuerdo a los resultados obtenidos para la distribución según etapa de desarrollo de los individuos muestreados, se puede concluir que la población se encontró compuesta principalmente por individuos juveniles o adultos fuera de su etapa de reproducción, resultado coincidente con la época de realización del estudio y con los hábitos reproductivos de las especies muestreadas.
- El tamaño muestral (n) establecido para la captura de especies nativas no permite la caracterización sobre composición y distribución de estas especies en los lagos muestreados.
- La proporción de individuos positivos a SPDV en las muestras de los lagos Chapo, Rupanco, Llanquihue, Tarahuín, Huillinco y Cucao corresponde a un 0%, mientras que para los lagos Natri, San Antonio, Tepuhueico y Popetán no se puede realizar tal afirmación al no cumplir con el tamaño de muestra necesario para conocer dicha proporción. Para estos lagos sólo se puede afirmar que la proporción de individuos positivos a SPDV en las muestras corresponde a un 0% y que podrían estar libres de este agente, pero no se pueden extrapolar estos resultados a las poblaciones presentes en ellos.
- Las restricciones impuestas a la extracción de individuos nativos de los lagos seleccionados para el estudio no permiten concluir el rol de estas especies en la diseminación, transmisión y mantención del virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV) así como de otros agentes patógenos en aquellos lagos con concesiones para la salmonicultura, al representar solo un 1,7% (5 de 297) de la muestra establecida por lago. Con el conocimiento de estas situaciones se podría determinar la presencia de especies reservorio para esta y para otras

enfermedades importantes para la industria salmonera y establecer planes de vigilancia y control adecuados a la situación de cada lago.

- Los resultados del presente estudio no permiten la determinación de factores de riesgo para la presencia del virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV) en las poblaciones de peces silvestres y asilvestrados, presentes en los lagos muestreados.

9. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados y a las situaciones ocurridas durante el desarrollo de esta memoria, es recomendable:

- Realizar estudios de caracterización de las poblaciones de peces silvestres y asilvestrados, en lagos con concesiones para la salmonicultura. Esto permitirá facilitar la extracción de estos individuos con fines científicos, para determinar su posible rol como reservorio de agentes patógenos que afecten a las especies productivas.
- Establecer un cálculo de tamaño de muestra proporcionado, que incorpore una cantidad suficiente de individuos silvestres y asilvestrados con el objetivo de aportar antecedentes suficientes para determinar el rol de las especies silvestres en la diseminación, transmisión y mantención del virus (SPDV) o de otros agentes en el ambiente.
- Realizar investigación nacional orientada a la determinación de los indicadores de las pruebas diagnósticas en base a las condiciones ambientales y técnicas en Chile.
- Realizar vigilancia para PD en los períodos en que es más probable la ocurrencia de brotes de la enfermedad y, por lo tanto, más probable de detectar (inicios de verano e inicios de otoño).
- Determinar factores de riesgo para el ingreso del virus de la enfermedad del páncreas del salmón (SPDV) a Chile.
- Muestrear salmónidos de cultivo presentes en las concesiones de los lagos muestreados para determinar la presencia del virus en las especies bajo las condiciones de producción.
- Promover la realización de estudios epidemiológicos orientados a la caracterización de enfermedades producidas por agentes biológicos transmisibles.

Si consideramos estos puntos en un programa de vigilancia de enfermedades exóticas, se puede lograr un mejor control sobre el estatus sanitario que presenta nuestro país, así como obtener estudios más sensibles y que permitan la obtención de una muestra de menor tamaño y más representativa de las poblaciones que interactúan en el ambiente lacustre y que pudiesen jugar algún papel en la transmisión de ésta y otras enfermedades.

10. BIBLIOGRAFÍA

- **ALDRIN, M.; STORVIK, B.; FRIGESSI, A.; VILJUGREIN, H.; JANSEN, P.** 2010. A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anemia in marine fish farms in Norway. *Prev. Vet. Med.* 93: 51-61.
- **AMTMANN, M.; FECCI, E.; GÓMEZ, S.** 2004. Competencias laborales de la industria salmonera y mano de obra rural en la comuna de Dalcahue, Provincia de Chiloé. Estudio de caso. Tesis de Postgrado, Magíster en Desarrollo Rural, Universidad Austral de Chile.
- **BASULTO, S.** 2003. El largo viaje de los salmones. Una crónica olvidada. Propagación y cultivo de especies acuáticas en Chile. Maval Ltda. Chile. 299 pp.
- **BOUCHER, P.; RAYNARD, R. S.; HOUGHTON, G.; BAUDIN-LAURENCIN, F.** 1995. Comparative experimental transmission of pancreas disease in Atlantic salmon, rainbow trout and brown trout. *Dis. Aquat. Organ.* 22: 19-24.
- **BOUCHER, P.; BAUDIN-LAURENCIN, F.** 1996. Sleeping disease and pancreas disease: comparative histopathology and acquired cross-protection. *J. Fish Dis.* 19: 303-310.
- **BRATLAND, A.; NYLUND, A.** 2009. Studies on the Possibility of Vertical Transmission of Norwegian Salmonid Alphavirus in Production of Atlantic salmon in Norway. *J. Aquat. Anim. Health* 21: 173-178.
- **CAMERON, A.; BALDOCK, F.** 1998. A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Prev. Vet. Med.* 34: 1-17.
- **CAMERON, A.** 2002. Survey Toolbox for Aquatic Animal Diseases: A Practical Manual and Software Package. Australian Centre for International Agricultural Research, Australia. 376 pp.
- **CAMERON, A.; GARDNER, I.; DOHERR, M. G.; WAGNER, B.** 2003. Chapter 4: Sampling Considerations in Surveys and Monitoring Systems. **En: SALMAN, M. D.** Animal Disease Surveillance and Survey Systems. Iowa State Press, USA. 222 pp.
- **CASTRIC, J.; CABON, J.; LE VEN, A.** 2005. Experimental study of vertical transmission of sleeping disease virus (SDV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). European Association of Fish Pathologist 12th International Conference of Fish and Shellfish Diseases, P95.
- **CHILE.** 2008. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Subsecretaría de Pesca. Resolución Exenta N° 2352.

- **CROCKFORD, T.; MENZIES, F. D.; McLOUGHLIN, M. F.; WHEATLEY, S. B.; GOODALL, E.A.** 1999. Aspects of the epizootiology of pancreas disease in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Ireland. *Dis. Aquat. Organ.* 36: 113-119.
- **DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H.** 2003. *Veterinary Epidemiologic Research.* Atlantic Veterinary College. 1st edition. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. 706 pp.
- **FERGUSON, H. W.; ROBERTS, R. J.; RICHARDS, R. H.; COLLINS, R. O.; RICE, D. A.** 1986. Severe degenerative cardiomyopathy associated with pancreas disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 20: 95-98.
- **FLEMING, I.** 1996. Reproductive strategies of Atlantic salmon: ecology and evolution. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6: 379-416.
- **FLEMING, I.** 2004. Reproductive ecology of cultured fish in the wild. *J. Fish Biol.* 65: 317-325.
- **FRINGUELLI, E.; ROWLEY, H. M.; WILSON, J. C.; HUNTER, R.; RODGER, H.; GRAHAM, D. A.** 2008. Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J. Fish Dis.* 31: 811-823.
- **GRAHAM, D.; FRINGUELLI, E.; WILSON, C.; ROWLEY, H.; BROWN, A.; RODGER, H.; McLOUGHLIN, M.; McMANUS, C.; CASEY, E.; McCARTHY, L.; RUANE, N.** 2009. Prospective longitudinal studies of salmonid Alphavirus infections on two Atlantic salmon farms in Ireland; evidence for viral persistence. *J. Fish Dis.* doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01096.x.
- **HODNELAND, K.; BRATLAND, A.; CHRISTIE, K. E.; ENDRESEN, C.; NYLUND, A.** 2005. New subtype of salmonid alphavirus (SAV), *Togaviridae*, from Atlantic salmon, *Salmo salar*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* in Norway. *Dis. Aquat. Org.* 66: 113-120.
- **HODNELAND, K.; ENDRESEN, C.** 2006. Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR. *J. Virol. Methods.* 131: 184-192.
- **HODNELAND, K.** 2006. Salmonid Alphavirus (SAV): Genetic characterization of a new subtype, SAV3, and implementation of a novel diagnostic method. PhD thesis. University of Bergen, Bergen, Norway. 73 pp.
- **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.

- **McLOUGHLIN, M. F.; NELSON, R. T.; McCORMICK, J. I.; ROWLEY, H. M.; BRYSON, D. G.** 2002. Clinical and histopathological features of naturally occurring pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 25: 33-43.
- **McLOUGHLIN, M. F.; PEELER, E.; FOYLE, K. L.; RODGER, H. D.; O'CEALLACHAIN, D.; GEOGHEGAN.** 2003. An epidemiological investigation of the re-emergence of pancreas disease in Irish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in 2002. Marine Environment and Health Series. 14.
- **McLOUGHLIN, M. F.; GRAHAM, D. A.** 2007. Alphavirus infections in salmonids: a review. J. Fish Dis. 30: 511-531.
- **McVICAR, A. H.** 1987. Pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* in Scotland: epidemiology and early pathology. Aquaculture 67: 71-78.
- **MONTERO, C.; MAGGI, C.; PARRA, C.** 2001. La industria del salmón en la X Región: un clúster globalizado. CEPAL, Santiago, Chile. 54 pp.
- **MUNRO, A.; ELLIS, A.; McVICAR, A.; McLAY, H.; NEEDHAM, E.** 1984. An exocrine pancreas disease of farmed Atlantic salmon in Scotland. *Helgoländer Meeresunters* 37, 571–586.
- **MURRAY, A.; PEELER, E.** 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. Prev. Vet. Med. 67: 223-235.
- **NELSON, R.; McLOUGHLIN, M.; ROWLEY, H.; PLATTEN, M.; McCORMICK, J.** 1995. Isolation of a toga-like virus from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with pancreas disease. Dis. Aquat. Organ. 22: 25-31.
- **NORRIS, A.; FOYLE, K. L.; RATCLIFF, J.** 2008. Heritability of mortality in response to a natural pancreas disease (SODV) challenge in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts on a West of Ireland sea site. J. Fish Dis. 31: 913-920.
- **PETTERSON, E.; SANDBERG, M.; SANTI, N.** 2009. Salmonid alphavirus associated with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 32: 477-479.
- **RODGER, H.; MITCHELL, S.** 2007. Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. J. Fish Dis. 30: 157-167.
- **RUANE, N.; RODGER, H.; GRAHAM, D.; FOYLE, L.; NORRIS, A.; RATCLIFF, J.; MURPHY, K.; MITCHELL, S.; STAPLES, C.; JEWURST, H.; TODD, D.; GEOGHEGAN, F.; Ó CINNEIDE, M.** 2005. Research on pancreas disease in Irish farmed salmon 2004/2005: Current and future initiatives. Marine Environment and Health Series. 22.

- **RUANE, N.; GRAHAM, D.; RODGER, H.** 2008. Pancreas disease in farmed salmon- Health Management and Investigations at Irish farm sites 2005-2008. Marine Environment and Health Series. 34.
- **SALMONCHILE. Departamento de estudios.** 2009. Ficha industria del salmón N° 12/2008.
- **SALMAN, M.** 2003. Chapter 1: Surveillance and Monitoring Systems for Animal Health Programs and Disease Surveys. En su: Animal Disease Surveillance and Survey Systems. Iowa State Press, USA. 222 pp.
- **SCHWERMER, H.; REDING, I.; HADORN, D.** 2009. Risk-based sample size calculation for consecutive surveys to document freedom from animal diseases. Prev. Vet. Med. 92: 366-372.
- **SMITH, P.; LARENAS, J.; VERA, P.** 2001. Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.21 (2).
- **SUBASINGHE, R.** 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. Prev. Vet. Med. 67: 117-124.
- **TAKSDAL, T.; OLSEN, A.; BJERKÁS, I.; HJORTAAS, M.; DANNEVIG, B.; GRAHAM, D.; McLOUGHLIN, M.** 2007. Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. J Fish Dis. 30: 545-558.
- **THRUSFIELD, M.** 2005. Veterinary Epidemiology. Blackwell Publishing, 3^a edition, Oxford, UK. 584 pp.
- **THURMOND, M.** 2003. Conceptual foundations for infectious disease surveillance. J. Vet. Diagn. Invest. 15: 501–514.
- **VIKE, S.; NYLUND, S.; NYLUND, A.** 2009. ISA virus in Chile: evidence of vertical transmission. Arch. Virol. 154:1-8.
- **WESTON, J. H.; WELSH, M. D.; McLOUGHLIN, M. F.; TODD, D.** 1999. Salmon pancreas disease virus, an alphavirus infecting farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Virology. 256: 188-195.
- **WESTON, J.; VILLOING, S.; BRÉMONT, M.; CASTRIC, J.; PFEFFER, M.; JEWURST, V.; McLOUGHLIN, M.; RODSETH, O.; CHRISTIE, K. E.; KOUMANS, J.; TODD, D.** 2002. Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. J. Vir. 76: 6155-6163.