



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



EVALUACIÓN DE LA INMUNOPROTECCIÓN DE UNA VACUNA
ORAL CONTRA LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN Y SU
EFECTO SOBRE LA MODULACIÓN DEL TRANSCRITO M_x EN
SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*)

MARIO STEFANO CARUFFO MADRID

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal.

PROFESOR GUÍA: JULIO LARENAS HERRERA
COLABORADOR: JAIME TOBAR RUBIO

FINANCIAMIENTO: LABORATORIO CENTROVET.

SANTIAGO- CHILE
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
 ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



EVALUACIÓN DE LA INMUNOPROTECCIÓN DE UNA VACUNA
 ORAL CONTRA LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN Y SU
 EFECTO SOBRE LA MODULACIÓN DEL TRANSCRITO Mx EN
 SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*)

MARIO STEFANO CARUFFO MADRID

Memoria para optar al Título
 Profesional de Médico Veterinario
 Departamento de Patología Animal.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JULIO LARENAS HERRERA
PROFESOR CONSEJERO: ULISES VERGARA CASTILLO
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO SMITH SCHUSTER

SANTIAGO, CHILE
 2012

**EVALUACIÓN DE LA INMUNOPROTECCIÓN DE UNA
VACUNA ORAL CONTRA LA ANEMIA INFECCIOSA DEL
SALMÓN Y SU EFECTO SOBRE LA MODULACIÓN DEL
TRANSCRITO M_x EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*)**

**ASSESSMENT OF THE IMMUNOPROTECTION OF AN ORAL
VACCINE AGAINST INFECTIOUS SALMON ANAEMIA AND
ITS EFFECT ON THE M_x TRANSCRIPT IN ATLANTIC
SALMON (*Salmo salar*)**

Mario Stefano Caruffo Madrid

Laboratorio de Investigación y Desarrollo Biológicos
CENTROVET

RESUMEN

La anemia infecciosa del salmón (ISA) es una enfermedad sistémica causada por un orthomyxovirus, la cual tiene un fuerte impacto económico-productivo en el salmón del Atlántico. Actualmente, existen comercialmente disponibles varias vacunas contra ISA, sin embargo, todas estas formulaciones son de carácter inyectable, generando estrés en los peces y dejándolos susceptibles a efectos adversos producto de la inyección y el manejo. En el presente trabajo, se evaluó una vacuna experimental contra ISA de entrega oral, que contiene como antígenos la hemoaglutinina-esterasa y la proteína de fusión del virus. Los resultados indican que la vacunación oral es capaz de inducir una protección efectiva frente al desafío con un aislado chileno de alta virulencia, correlacionado con la inducción de anticuerpos IgM específicos contra el virus. Por otra parte, la vacuna fue incapaz de modular la expresión del transcrito con rol antiviral Mx, indicando la importancia de la respuesta humoral en la supervivencia a la enfermedad. Este estudio provee nuevo conocimiento sobre la protección entregada por una vacuna oral contra ISA, siendo de ayuda en el desarrollo de nuevos métodos preventivos o validación de los ya existentes.

Palabras clave: Virus de la anemia infecciosa del salmón, ISAV, vacunación, *Salmo salar*, anticuerpos.

ABSTRACT

Infectious salmon anemia (ISA) is a systemic disease caused by an orthomyxovirus, which has a strong economic and productive impact in Atlantic salmon. Currently, there are commercially available several vaccines against ISA, however, those products are applied through injection, generating stress in the fish leaving them susceptible to adverse effects due to injection and handling. In this study it was evaluated an oral vaccine against ISA containing as antigens recombinant viral hemagglutinin-esterase and the viral fusion protein. Our findings indicate that oral vaccination is able to induce effective protection against challenge with a high-virulence Chilean isolate, correlated with the induction of IgM-specific antibodies. On the other hand, the vaccine was unable to modulate expression of the antiviral related gene Mx, Indicating the importance of the humoral response to the disease survival. This study provides new knowledge about the protection provided by an oral vaccine against ISA, being helpful in the development of new preventive methods or validation of existing ones.

Keywords: Infectious salmon anaemia virus, ISAV, vaccination, *Salmo salar*, antibodies.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres y hermanas por su eterno amor y apoyo. A mi abuelita que ha sido un pilar fundamental en mi formación como persona. Sumado al cariño y apoyo de mis tíos, primos y sobrino. Les agradezco infinitamente vuestro amor, sin ustedes nada de esto sería posible. Compartan y disfruten este logro por que también les pertenece.

Quiero agradecer también a mis amigos que me han acompañado en este largo camino universitario, compartiendo aventuras, logros y fracasos, muchas gracias en especial a los sectarios!. A Daniela, mi polola que ha sido un soporte de resiliencia y apoyo no solo como colega médico veterinario sino como compañera de vida y aventuras, infinitas gracias!.

El presente trabajo no podría haber sido llevado a cabo, sin el soporte del laboratorio Centrovét, el que fue una gran escuela! agradezco en especial al Dr. Jaime Tobar, quién fue un verdadero maestro a quien le estoy muy agradecido por la constante confianza depositada en mi. Agradezco también al persona técnico y a mis compañeros de trabajo en especial a aquellos con quién forje una gran amistad.

También debo agradecer a mi profesor tutor, el Dr. Julio Larenas, por su constante preocupación en el desarrollo del proyecto, disposición para atender mis dudas, así como su generosidad para compartir sus conocimiento y expertiz en la patología de peces, muchísimas gracias.

Finalmente debo agradecer a esas personas que lamentablemente ya no están físicamente con nosotros. Sin embargo, nos acompañan en recuerdo. A mi tío Daniel, gracias por inculcarme el amor por los animales y la lectura, a mi Nono, gracias por tu apoyo, de seguro estarías muy contento gritando "*Dottore Caruffo*".

A strong man doesn't need to read the future, he makes his own...

Solid Snake.

INTRODUCCIÓN

La anemia infecciosa (ISA), es una enfermedad sistémica que afecta a los salmónidos, principalmente al salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la cual tiene un impacto tanto a nivel económico como productivo. La enfermedad fue descrita por primera vez en Noruega en 1984 y desde entonces, se han registrado brotes de la enfermedad en Canadá, Escocia, Islas Faroe, Estados Unidos y Chile (1).

El agente etiológico de la enfermedad es el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, siendo el único perteneciente al género *Isavirus*. Al igual que el ortomixovirus de la influenza, el virus ISAV es un virus envuelto, su genoma está compuesto de ocho segmentos de ARN monocatenario con polaridad negativa que varía en longitud de 1,0 a 2,4 Kb con un tamaño molecular aproximado de 14,3 Kb (2).

Sus partículas virales corresponden a viriones envueltos de 90-140 nm de diámetro (3) con proyecciones en su superficie de 13-15 nm de longitud con forma de hongo correspondiente a la proteína hemoaglutinina esterasa (HE) (4), que a diferencia de lo que ocurre en el virus influenza la función hemoaglutinina y esterasa, ocurre en la misma proteína (HE), mientras que la actividad de fusión, se encuentra en otra proteína (Proteína F) (2).

Las mortalidades asociadas a la enfermedad varían de un 10% a un 95% (5), sin embargo las medidas sanitarias de manejo en Chile evitan que los brotes se desarrollen hasta esos niveles, pues exigen actualmente cosechar los peces con bajos niveles de mortalidad (6). Los principales signos clínicos asociados a la enfermedad, corresponden a peces letárgicos y próximos a las orillas de sus jaulas, con síntomas externos típicos como branquias pálidas, exoftalmia, petequias en la cámara ocular y hemorragias epidérmicas especialmente en el abdomen (7). Al examen *post mortem* los hallazgos son principalmente trastornos circulatorios en varios órganos debido al daño endotelial en los vasos sanguíneos periféricos (5).

El desarrollo de vacunas inyectables intraperitoneales (IP), basadas en adyuvantes oleosos que contienen como antígeno el agente viral inactivado, han sido una de las estrategias más usadas para prevenir las pérdidas causadas por el virus, es así como la totalidad de las vacunas utilizadas en Canadá y Estados Unidos utilizan esa estrategia (8). Sin embargo, los reportes científicos sobre los mecanismos de acción y efectividad de estas vacunas son escasos. Por ejemplo, Jones *et al* (9) reportaron resultados de porcentaje relativo de supervivencia (RPS) de 92-96% frente a la vacunación con una vacuna viral inactivada y posterior desafío por cohabitación. Por otra parte, frente a la misma vacuna y desafío IP el RPS obtenido fue de 0%.

Si bien el desarrollo de vacunas comerciales se ha concentrado en vacunas virales inactivadas en formulaciones poli y monovalentes, algunos investigadores han desarrollado alternativas basadas en antígenos recombinantes y vacunas de tipo ADN (8, 10). Las vacunas inyectables presentan ciertos inconvenientes logísticos, relacionados con la manipulación de los peces y el consiguiente estrés asociado, el que repercute directamente en el sistema inmune del individuo causando inmunosupresión (11). Sumado a lo anterior se presentan adversos relacionados con infección en el sitio de inoculación, así como melanosis y adherencias debido a la reacción inflamatoria intraperitoneal (11). Efectos que tienen una repercusión económica directa. Es por esto, que la investigación orientada al desarrollo de nuevas alternativas para la administración de vacunas para peces de cultivo y su caracterización en términos de las interacciones moleculares entre el agente infeccioso y el hospedero, así como el entendimiento del rol que cumple la vacuna en la estimulación de mecanismos innatos y adaptativos de defensa, resultan fundamentales para validar y mejorar las tecnologías de vacunación actuales.

Los peces teleósteos presentan un sistema de defensa antiviral innato basado en la producción de interferón (IFN) (12, 13) que representa la primera línea de defensa contra agentes infecciosos virales, tales como ISAV o el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) (14). Existen dos clases de IFN, el tipo I (IFN α,β) producido por cualquier tipo celular nucleado y el tipo II (IFN γ) el que es producido por células inmunes especializadas. El IFN-II forma parte de la respuesta adaptativa, mientras que el IFN-I es un importante mediador de la respuesta inmune innata (15). Una vía rápida de señalización induce la expresión de una serie de proteínas, incluida la proteína Mx, con propiedades antivirales directas e indirectas (16). Por otro lado la mayoría de los virus se encuentran equipados con diversas estrategias para evadir este poderoso mecanismo de defensa temprana, a menudo con proteínas especializadas (17). En el caso del virus ISAV se ha descrito que los segmentos 7 y 8 del virus, tendrían un efecto antagonizador de interferón, similar a la proteína NS1 del virus influenza (18, 19). La inducción de IFN por IPNV o ISAV incluye complejas interacciones hospedero patógeno y puede desempeñar un papel en la determinación de los estados de resistencia y susceptibilidad. Se han descrito efectos antivirales inducidos por IFN contra IPNV tanto *in vitro* como *in vivo*, pero los mecanismos no están completamente dilucidados (14, 20). Si bien se ha demostrado una relación entre la expresión de Mx y la inhibición de IPNV, esta relación no se ha descrito en ISAV (21-24).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vivo* la eficacia de una vacuna oral recombinante contra ISA. Así, como de sus componentes en distintas formulaciones vacunales, frente al desafío experimental contra un aislado nacional de alta virulencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Peces

En este trabajo se utilizaron 660 peces *Salmo salar* no vacunados y clínicamente sanos, obtenidos de la piscicultura Talca chico, Región del Maule, con un peso promedio de 40 g. Los peces fueron aclimatados y mantenidos en cuarentena durante 14 días en un estanque de recirculación de 1 m³ con una densidad 15 kg/m³ y con una tasa de recambio de agua 1 m³ por hora a 17,3 °C (\pm 0,2). Las condiciones del agua fueron: pH 7,4 y saturación de oxígeno 80-130%. Los peces fueron alimentados *ad libitum* (Golden Activa calibre 2,0 mm, Biomar). Un grupo de 10 peces fue sometido a eutanasia a modo de establecer su estado sanitario, realizándose necropsia y toma de muestras de riñón, branquias y corazón, las que fueron evaluadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para presencia de ISAV e IPNV, encontrándose negativos a ambos agentes infecciosos. Previo a la manipulación, todos los peces fueron anestesiados por inmersión en benzocaína (Kalmagin 20%, Centrovét). Posteriormente los peces fueron trasladados en grupos de 55 peces a estanques de 100 L, insertos en un sistema de reutilización de agua (tasa de renovación del sistema 1 a 1,5 veces por hora) a 17,3 °C (\pm 0,2). Las condiciones del agua fueron: pH 7,4-7,9, saturación de oxígeno 90-140%, densidad de peces 22 kg/m³.

2. Vacunas y Virus

La vacuna a utilizar fue desarrollada con tecnología de ADN recombinante en un vector heterólogo, *Sacharomyces cerevisiae*, utilizando como antígenos las proteínas de superficie del virus ISA HE y proteína F. Estos antígenos fueron encapsulados en una matriz polisacárida catiónica (Micromatrix™, Advanced BioNutrition, USA), desarrollada en el laboratorio como matriz de la vacuna oral SRS actualmente comercializada (25). Se formularon cinco vacunas orales con diferentes componentes (**Tabla 1**), incorporando grupos controles. En el ensayo fueron utilizadas estas cinco formulaciones, además de un control que consistió en alimento comercial (Golden Activa calibre 2,0 mm, Biomar) embebido en aceite de maravilla.

Las vacunas fueron entregadas a los peces a través del alimento (Golden Activa calibre 2,0 mm, Biomar), para lo cual el alimento fue recubierto con aceite agregándose la mezcla vacunal liofilizada en una concentración final equivalente a la vacuna de 6 mg/pez/día. La inmunización oral se realizó durante 10 días mediante régimen de entrega AM-PM. El inóculo viral utilizado en el desafío, corresponde a la cepa HPR7b aislado de un brote ocurrido en terreno en diciembre del 2007 en la Región de Los Lagos, Chile. El virus fue expandido en cultivos celulares

utilizando la línea celular SHK-1 y medio Leibovitz 15 (L-15, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone, Thermo Scientific) 1%, L-glutamina (L-glutamine 200 mM Solution, Hyclone) y 1% de aminoácidos no esenciales (MEM Non-Essential Amino Acids Solution 100X, Gibco) previo a su uso.

3. Diseño experimental y muestreo

Los desafíos experimentales fueron llevados a cabo en la unidad experimental de acuarios del laboratorio Centrovét (Centrovét, Santiago, Chile). Los peces fueron seleccionados al azar de una población reserva y dispuestos en líneas experimentales con estanques de 100 L en grupos de 55 peces por estanque, densidad de 22 kg/m³. El diseño experimental comprendió 12 grupos de 55 peces, 6 grupos desafiados y 6 grupos sin desafiar, ubicados en líneas experimentales distintas y aisladas. La mortalidad del grupo desafiado fue registrada hasta el día 53 post desafío. El modelo de transmisión elegido para el desafío fue mediante inoculación IP, ya que este método es considerado altamente reproducible y fiable en la evaluación de vacunas (26). A las 450 unidades térmicas acumuladas (UTA) post vacunación los peces del grupo desafiado fueron sometidos a infección experimental por vía IP con 0,2 mL del aislado viral aproximadamente 3×10^6 TCID₅₀/pez. De manera similar el grupo no desafiado fue inoculado con 0,2 mL de medio L-15.

Se realizaron registros diarios de mortalidad y se tomaron muestras de sangre y riñón anterior de 3 peces por grupo (tanto en el grupo desafiado como en el no desafiado) a diferentes tiempos de muestreo, como se detalla en la **Figura 1**. Las muestras de riñón se almacenaron a -20 °C en RNA Later (Ambion, Invitrogen) y la sangre fue procesada para extracción de suero y posteriormente almacenado a -20 °C hasta su uso.

4. ELISA

Las placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) fueron activadas con 5 µg de una mezcla equimolar de los antígenos vacunales expresados en *E. coli* BL21 (DE3) en tampón bicarbonato, pH 8,5. Las placas fueron bloqueadas con leche descremada al 2% en PBS. Las muestras de suero fueron incubadas en las placas toda la noche, al día siguiente las placas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgM de salmón, isotipo IgG1 (BiosChile, IGSA, Chile) por 1 hora a 30 °C. Las placas posteriormente fueron lavadas nuevamente e incubadas con un anticuerpo de cordero anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (KPL, USA). Los anticuerpos séricos fueron determinados usando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina como sustrato

cromogénico y H_2SO_4 para detener la reacción. Los valores fueron obtenidos midiendo la absorbancia a 450 nm.

5. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN fue extraído a partir de las muestras de riñón anterior, utilizando un “kit” comercial (AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit, Axygen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, posteriormente eluido en tampón TE y almacenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. El material genético fue cuantificado espectrofotométricamente (Infinite 200 PRO, TECAN) y su integridad determinada mediante geles de agarosa. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó mediante el uso de un kit comercial (ImProm-II™, Promega), utilizando como templado $1\text{ }\mu\text{g}$ de ARN y “random primers” (Promega) $0,5\text{ }\mu\text{g}$ por reacción. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, el ADN complementario (ADNc) fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6. PCR Tiempo real

La reacción de PCR en tiempo real, fue llevada a cabo mediante el uso del equipo Step One de 48 pocillos (Applied Biosystems). Los partidores fueron obtenidos de acuerdo al trabajo de McBeath *et al* (14), los transcritos a evaluar correspondieron a la proteína Mx (Mx) y al factor de elongación 1α (ELF) (**Tabla 2**). Los partidores fueron desarrollados en los sitios de “splicing”, para excluir la potencial amplificación de ADN genómico. Luego $2\text{ }\mu\text{L}$ de ADNc fue agregado a la siguiente mezcla y contenidos en pocillos individuales en placas ópticas de 48 pocillos (48-Well $0,1\text{ mL}$ Plastics, Applied Biosystems): $5\text{ }\mu\text{L}$ Evagreen® 2x PCR mix (Fast-Plus EvaGreen Master Mix, Biotium), partidores $0,5\text{ }\mu\text{M}$, ADNc $2\text{ }\mu\text{L}$, ROX $1\text{ }\mu\text{L}$, $1\text{ }\mu\text{L}$ de dH_2O . Las condiciones de termociclado fueron $25\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 s , $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min , seguido de 40 ciclos de $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 s , $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 40 s y $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 s . La expresión relativa del ARNm fue calculada utilizando el método del $\Delta\Delta\text{CT}$ ajustado para la eficiencia de los partidores.

7. Análisis de datos

Los cálculos y análisis estadísticos fueron realizados mediante el uso del software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). El RPS, fue calculado para cada grupo inmunizado, utilizando la siguiente formula:

Las curvas de supervivencia fueron analizadas utilizando la prueba estadística no paramétrica de Kaplan-Meier y el grupo de las diferencias en el tiempo de supervivencia fueron analizadas mediante la prueba de log-rank, utilizando la corrección de Bonferroni en las comparaciones

múltiples. Además, para valorar la eficacia de los diferentes tratamientos se calculó, la reducción absoluta de riesgo (RRA) y el número necesario de animales a tratar (NNT), con un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias en la ganancia de peso e inducción de anticuerpos, fueron evaluados entre los diferentes tratamientos mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos colas para medidas repetidas y posterior comparación de Bonferroni comparando cada tratamiento. El análisis de los resultados de RT-qPCR fueron calculados relativos a los transcritos de ELF, presentándose como expresión relativa ($=2^{-\Delta\Delta C_t}$) relativa al día 0 post vacunación (PV) (media de 3 peces) para muestras colectadas PV pero previo al desafío y al día 0 post desafío (PD) (media de 3 peces) para muestras colectadas PD. Las diferencias entre grupos fueron analizada mediante ANOVA con posterior prueba de Newman-Keuls. Valores de $P \leq 0,05$, fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Inmunización con la vacuna oral y supervivencia frente al desafío

El período de mortalidad evaluado, correspondió al inicio del desafío experimental y finalizó a los 53 días post desafío (DPD). Como método de diagnóstico de la enfermedad se realizó necropsia de las mortalidades durante el desafío, según lesiones características descritas en la literatura (1, 27).

La curva de mortalidad del grupo control fue casi idéntica a la de los grupos vacunados con levadura no-recombinante no-encapsulada, levadura no-recombinante encapsulada y con la microcápsula vacía (sin antígeno) a los 42 DPD, obteniéndose mortalidades acumuladas para estos grupos de 93,3%, 93,3%, 86,7% y 89,7% respectivamente. El grupo inmunizado con los antígenos recombinantes no encapsulados presentó una mortalidad acumulada del 70% a los 21 DPD y el grupo inmunizado con la vacuna (antígenos recombinantes encapsulados), presentó una mortalidad acumulada del 33,3% a los 20 DPD, porcentajes que se mantuvieron sin cambios hasta el final del ensayo a los 53 DPD (**Figura 2**). Los grupos tratados y no desafiados no presentaron mortalidades durante el transcurso del ensayo.

Las diferencias entre las curvas de supervivencia (**Figura 3**) fueron evaluadas mediante el uso de la prueba de Log-rank, presentándose diferencias significativas. Comparaciones en pares en relación al control, indican que aquellos peces tratados con el antígeno encapsulado presentan un porcentaje de supervivencia mayor y altamente significativo a diferencia de los otros tratamientos utilizados, de los cuales ninguno presentó diferencias significativas en relación al control (**Tabla 3**).

Evaluación de la eficacia de los diferentes tratamientos

Para evaluar la eficacia de las diferentes formulaciones experimentales se calculó el RPS y el RRA, indicadores que tienen como función estimar la reducción del riesgo de muerte por ISAV frente a los tratamientos (de manera relativa y absoluta, respectivamente). También se evaluó el NNT, el que se define como el número de animales a tratar de manera experimental a fin de evitar que uno desarrolle un resultado negativo, en este caso la muerte por ISAV (**Tabla 4**).

La valoración de la eficacia de las diferentes formulaciones utilizadas mostró una reducción en la mortalidad variable. El grupo inmunizado con los antígenos recombinantes encapsulados presentó un RPS del 64,3% , RAR del 60% (IC del 95%, 41-79) y un NNT = 2 (IC del 95%, 1,3-

2,4). El grupo antígeno no encapsulado presentó un RPS del 25%, RAR del 23,3% (IC del 95%, 4,7-42) y un NNT = 5 (IC del 95%, 2,4–21,4). Los otros tratamientos experimentales presentaron un RPS no superior al 7,1% y RAR no mayor al 6,7% con intervalos de confianza con límites inferiores negativos, por lo que no fue posible evaluar si estos tratamientos eran beneficiosos y no producirán cambio alguno o generarán daño, en relación al control (**Tabla 4**).

La vacunación oral y la ganancia de peso en los peces

Estudios previos han demostrado que tanto la vacunación por inmersión como por vía oral activan células inflamatorias en el sitio de contacto con el antígeno, lo que genera la secreción de anticuerpos en varios tejidos tales como la piel, hígado y la mucosa intestinal (28). Debido a que la vacunación oral genera una respuesta local específica (25, 29), se determinó el efecto de la vacunación oral en la ganancia de peso. Una vacunación oral exitosa no debe afectar la función intestinal o causar problemas de absorción de nutrientes. Como una manera de determinar si la vacunación oral interfiere con la absorción de nutrientes, se evaluaron los efectos potenciales en la ganancia de peso de los diferentes tratamientos así como en el grupo control. La **figura 4** muestra que los grupos tratados no presentaron diferencias significativas en relación al grupo control. Resultados que sugieren que tanto el antígeno encapsulado en su conjunto, así como sus diferentes componentes no afectarían la absorción de nutrientes (25).

Respuesta humoral frente a la vacunación y desafío

No se detectaron anticuerpos específicos contra ISAV previo a la vacunación en ninguno de los grupos experimentales en estudio. De los cinco grupos experimentales inmunizados, sólo el grupo correspondiente a la vacuna (antígeno recombinante encapsulado) presentó un aumento significativo de anticuerpos específicos, el que fue detectable en el suero de los salmónidos tanto desafiados como no desafiados a las 330 UTA post desafío (**Figura 5**). El aumento de anticuerpos específicos anti ISAV en el grupo antígeno encapsulado, fue significativo en relación al control.

El transcrito Mx y su expresión post desafío

En ambos grupos pre y post vacunación los niveles de expresión de Mx se mantuvieron relativamente bajos (**Figura 6**), situación que cambió en el grupo desafiado posterior al desafío a las 450 UTA (**Figura 6. B**), en donde se observó un aumento de expresión del transcrito sobre las 30 veces a las 630 UTA, situación que no se observó en el grupo no desafiado (**Figura 6. A**), en el cual la expresión relativa del transcrito se mantuvo estable durante el transcurso del

ensayo. Sin embargo, en el grupo desafiado no se observó una diferencia significativa en la inducción del transcrito entre las diferentes formulaciones vacunales utilizadas.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la eficacia de inmunización con los diferentes componentes de una vacuna oral recombinante contra ISAV, así como la evaluación de parámetros inmunológicos post vacunación y desafío.

Los resultados muestran que el RPS obtenido posterior a la inmunización con las diferentes formulaciones se relaciona con la presencia del antígeno y su posterior encapsulación. El grupo antígeno encapsulado presentó un RPS del 64,3%, demostrando que la formulación es capaz de inducir una buena protección contra ISAV. Las curvas de mortalidad de las otras formulaciones incluida la del grupo control sin vacunar fueron similares, sin presentar diferencias significativas entre ellas, demostrando de esta manera que la inmunización con los antígenos no encapsulados, la matriz de encapsulación o la levadura por sí solos no son capaces de entegar protección 450 UTA post vacunación.

Entre los peces desafiados el primero murió a los 13 DPD, mortalidad que se incrementó a partir del día 15. Resultados que se encuentran en concordancia con los 10 a 20 días de período de incubación descritos en la literatura para la infección experimental con ISAV (30-32). La mortalidad acumulada del control sin vacunar fue de un 93,3%, indicando la alta letalidad del aislado viral utilizado, posicionándolo dentro de los aislados de alta virulencia según la clasificación generada por Kibenge (33). Todos los peces que murieron durante el desafío presentaron lesiones bastante severas, compatibles con ISAV (5) (**Figura 7**).

El aislado viral utilizado en el presente trabajo, corresponde a la cepa chilena HPR7b, causante de la epizootia más grave registrada en la historia de la industria salmonera (1). Es por esta razón que la comparación de resultados con otros trabajos presentes en la literatura es compleja, pues la gran mayoría de ellos realiza desafíos utilizando aislados noruegos, los que difieren de los nacionales tanto en su virulencia como en su componente genético (30, 34).

La alta mortalidad del grupo control tuvo su efecto en los valores de RPS, los que tendieron a ser bajos. Son escasos los estudios que han evaluado la eficacia de formulaciones vacunales frente a ISAV, dentro de los cuales ninguno ha evaluado formulaciones de tipo oral. Mikalsen *et al* (10), evaluó una vacuna de tipo ADN obteniendo como resultado un RPS de 60,5% con una mortalidad acumulada del control de 41,3%, frente al desafío IP (10). Jones *et al* (9), evaluaron una virina inyectable la que presentaba un RPS 92-96% al ser los peces desafiados por cohabitación, pero frente a desafío intraperitoneal el RPS fue de 0% (9). Lauscher *et al*,

evaluaron diferentes virinas, obteniendo un RPS del 86%, mediante cohabitación con una mortalidad acumulada del grupo control de 71,7% (32). Los resultados de eficacia obtenidos en el presente trabajo para una formulación oral contra ISA, son los primeros descritos en la literatura y tomando en cuenta los valores de los grupos controles en los trabajos publicados, en especial el de Mikalsen que utiliza desafío IP con una mortalidad acumulada del grupo control del 41,3%, lo que se contrasta al 93,3% obtenido en el presente estudio. Podemos concluir que la vacuna fue evaluada con un aislado de alta letalidad, si bien los valores de RPS obtenidos son bastante aceptables para una vacuna de este tipo, es probable que se encuentren subestimados.

La eficacia de las formulaciones vacunales ya sea en estudios experimentales y de campo ha sido evaluada tradicionalmente mediante el RPS, método que permite evaluar en forma objetiva los resultados de una vacuna (26). Sin embargo, presenta diversas desventajas tales como mostrar los beneficios de los tratamientos en términos relativos (35), los resultados son dependientes de los factores que interactúan durante el experimento y son exclusivos a los diferentes modelos utilizados (36), por lo que al obtener diferentes resultados de RPS con distintas vacunas y en diferentes ambientes, se dificulta la comparación entre ellos (37). Es por estas razones que en el trabajo se evaluaron otros parámetros de efectividad, tales como el RAR y NNT (**Tabla 4**), los que expresan de una manera evidente los beneficios de utilizar un tratamiento o actividad preventiva sobre un control, en este caso la vacunación. La evaluación de estimadores adicionales de eficacia entregaron buenos resultados para el tratamiento antígeno encapsulado con un RAR del 60% (IC 95% 41-79) y NNT de 2 (IC 95% 1,3 -2,4). El grupo antígeno no encapsulado presentó un RAR del 23,3% y un NNT de 28, ambas cifras con IC bastante amplios (IC 95% 4,7-42 y 2,4-21,4, respectivamente). Los tratamientos de inmunización con la microcápsula vacía y levadura no-recombinante encapsulada presentaron valores de RAR muy bajos o con intervalos de confianza con valores negativos. Esto no nos permite asegurar si el tratamiento es capaz de producir algún beneficio o por el contrario genera algún efecto adverso. Por otro lado, el tratamiento levadura no-recombinante no encapsulada no presentó diferencia alguna con el control.

La inmunización oral con la formulación antígeno encapsulado a diferencia de las otras formulaciones utilizadas, fue capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos sistémicos tanto en los grupos no desafiados como desafiados. En peces teleósteos se ha descrito la existencia de inmunidad de mucosas (38-40), en donde IgT una inmunoglobulina especializada de mucosas toma gran importancia (29). Sin embargo, debido a las escasas

herramientas disponibles para evaluar la respuesta inmune en salmónidos, la evaluación de inmunidad mucosal no se llevó a cabo y sólo se evaluó la respuesta basada en IgM sistémica. No obstante, al administrar una vacuna oral y por consiguiente estimular el tejido linfoide asociado a mucosas, la producción de anticuerpos mucosales es bastante esperable, de igual manera que estos anticuerpos cumplan un importante rol en la determinación de supervivencia a la enfermedad (25), ya que una de las vías de infección importante del agente corresponde a las branquias (31), sector en donde los anticuerpos mucosales podrían cumplir un rol determinante.

El presente trabajo consideró solo una prima vacunación, razón que explicaría en parte los bajos niveles de anticuerpos obtenidos tanto en los grupos desafiados como aquellos no desafiados previo al desafío. No obstante, en el grupo desafiados 290 UTA post desafío se observó una gran inducción de anticuerpos específicos en el grupo vacunado, indicativo de una respuesta secundaria dada por el reencuentro con el antígeno, en este caso el agente infeccioso (**Figura 5**). Es sabido que repetidas exposiciones frente al antígeno aumentan la magnitud y especificidad de la respuesta inmune. En un estudio realizado por Mikalsen (10) en donde se inmunizan peces mediante el uso de una vacuna ADN contra ISA, se describe que los anticuerpos específicos sólo son detectables posterior al desafío y no previo a este. Sin embargo, en el presente trabajo se demuestra que la inmunización oral es capaz de inducir la producción de anticuerpos ISAV específicos previo al desafío, resultado que coincide con lo descrito por Lauscher (32) utilizando una virina inyectable. Adicionalmente, en el presente trabajo se observa una fuerte inducción de anticuerpos 290 UTA post desafío, sugiriendo que algún grado de memoria inmunológica se generó frente a la primovacuna. La importancia de los anticuerpos en la determinación de supervivencia o muerte en la enfermedad ha sido descrita en otros trabajos ya sea por inmunización pasiva, mediante la transferencia de suero de peces convalecientes (41) o inmunización activa mediante el uso de una virina (32), lo que afirma la importancia de los factores humorales en la inmunidad frente a ISAV. La habilidad del salmón del Atlántico de producir anticuerpos neutralizantes contra ISAV ha sido descrita en otros estudios, presumiéndose que serían directamente contra HE (32, 41, 42); sin embargo los títulos son generalmente bajos (3, 10).

Como en la mayoría de las interacciones hospedero patógeno, la resistencia del hospedero es altamente dependiente tanto de la virulencia del agente infeccioso así como de la capacidad del hospedero de montar una respuesta inmune efectiva contra este. Varios estudios han evaluado la interacción entre ISAV y el salmón del Atlántico, ya sea mediante ensayos *in vitro* utilizando

diferentes líneas celulares (23, 43, 44) e *in vivo* en salmón del Atlántico con diferentes aislados del virus (43, 45). Todos ellos han evidenciado un aumento en la expresión de diversos genes asociados a inmunidad innata en el desarrollo de la infección. Sin embargo, a pesar de esta potente respuesta antiviral, la gran mayoría de los peces sucumben a la infección con aislados de alta virulencia (45).

El riñón anterior de los salmónidos, no cumple una función renal sino que es el principal sitio de generación de linfocitos B y está constituido principalmente de tejido linfoide (46). Es por esto que se seleccionó el riñón anterior como órgano blanco para el análisis de expresión génica. La proteína Mx, la cual es inducida por IFN-I, corresponde a un marcador de la respuesta inmune innata frente a infecciones virales y su rol en la defensa antiviral ha sido documentado extensamente (47). Es así, como en la necrosis pancreática infecciosa causada por el birnavirus IPNV determinarían estados de susceptibilidad / resistencia de post smolts a la infección (14) y ha demostrado tener un efecto inhibitorio en la replicación viral (22). Sin embargo, ha demostrado tener poco o ningún efecto en la replicación de ISAV tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. En el presente trabajo se observó una fuerte inducción del transcrito de Mx en los grupos desafiados no así en los no desafiados. Sin embargo, el aumento de expresión no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, indicando que ninguna de las formulaciones utilizadas fue capaz de modular la vía y que los altos niveles de expresión del transcrito Mx se deberían directamente a la infección por ISAV.

Si bien los resultados tienen un carácter preliminar, estos son concordantes con resultados de trabajos previos realizados en condiciones experimentales similares e independientes, demostrando la concordancia y repetitividad de los resultados del presente trabajo (48, 49).

El trabajo futuro debe ir orientado en la evaluación de la respuesta frente a la re inmunización (efecto “booster”) y posterior desafío. También a la determinación de la carga viral, evaluando la inducción de inmunoglobulinas mucosales, tanto IgT como IgM, las que frente a la inmunización oral deberían presentar una alta inducción, jugando un rol determinante en evitar la entrada del agente infeccioso y por consiguiente bajas cargas virales.

CONCLUSIÓN

Los resultados demuestran que la inmunización con una vacuna de administración oral es capaz de inducir una protección significativa frente al desafío experimental intraperitoneal con un aislado de alta virulencia y que esta protección es altamente dependiente de cómo se entregue el antígeno y la integridad de éste. Atributo dado por la combinación de los antígenos recombinantes específicos más la tecnología de entrega, ya que dentro de los diferentes tratamientos el antígeno encapsulado en Micromatrix™ fue el que entregó los mejores resultados, y ninguno por separado presentó niveles de protección comparables. La supervivencia de los individuos vacunados oralmente en el presente trabajo es similar o incluso superior que aquellos vacunados con una formulación de tipo inyectable (9, 10, 32), aún cuando el desafío experimental que se llevó a cabo para evaluar su eficacia, presentó mortalidades acumuladas superiores a las descritas en todos los trabajos citados.

La observación de la respuesta inmune en los diferentes tratamientos indica la relevancia de la respuesta humoral en la supervivencia a la enfermedad. Sin embargo, la protección de los peces vacunados no se relaciona con los perfiles de expresión del transcrito Mx.

La tecnología descrita, fue capaz de inducir inmunidad protectora frente a ISAV y elimina los problemas comúnmente asociados a formulaciones orales, protegiendo el antígeno y reclutando elementos inmunológicos para potenciar la respuesta protectora. Adicionalmente, presenta diversas ventajas logísticas por sobre la vacunación inyectable, tales como reducir los manejos necesarios para la vacunación disminuyendo el estrés y costos asociados. Así como la posibilidad de aplicar “boosters” en el periodo de engorda en agua de mar.

ANEXOS

Tabla 1. Detalle de las formulaciones de inmunización, vacunas y control, utilizadas en el estudio.

Tratamientos	Detalle
Antígeno recombinante encapsulado (Vacuna)	Polvo liofilizado de extracto de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> recombinante para los antígenos de superficie del virus ISA y encapsulados en la matriz polisacárida catiónica (Micromatrix™).
Microcápsula vacía	Polvo liofilizado que contiene la matriz polisacárida catiónica (Micromatrix™) sin antígeno.
Levadura recombinante no encapsulado (Levadura RN NE)	Polvo liofilizado de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , recombinante para los antígenos de superficie del virus ISA, sin encapsulación con la matriz polisacárida catiónica (Micromatrix™).
Levadura no recombinante no encapsulada (Levadura NR NE)	Polvo liofilizado de extracto de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> no transformado "Wild Type", sin encapsulación con la matriz polisacárida catiónica (Micromatrix™)..
Levadura no recombinante encapsulada (Levadura NR EN)	Polvo liofilizado de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> no transformado "Wild Type", encapsulados en la matriz polisacárida catiónica (Micromatrix™).
Control	Alimento embebido en aceite.

Tabla 2. Secuencias de los partidores usados en el análisis de PCR en tiempo real.

Gen	No. acceso Genbank	Nombre	Secuencia 5´- 3´	Tamaño (bp)
Factor de elongación 1 α	AF321836	ELF	F: CCCCTCCAGGACGTTTACAAA R: CACACGGCCCCACAGGTACA	57
Mx1 y Mx2	U66475 U66476	Mx	F: GATGCTGCACCTCAAGTCCTATTA R: CGGATCACCATGGGAATCTGA	73

Tabla 3. Diferencias entre las curvas de supervivencia de los diferentes tratamientos en relación al control, frente al desafío con el virus de la anemia infecciosa del salmón (comparación por pares, análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, Prueba de Log-rank).

Tratamientos	Diferencias en tratamientos: P-values				
	Vacuna	Microcápsula vacía	Levadura recombinante no encapsulado	Levadura no recombinante no encapsulada	Levadura no recombinante encapsulada
Control	<0,0001	0,3265	0,0404	0,8334	0,8355

Diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, Bonferroni (P = 0,01).

Tabla 4. Cálculo de índices de eficacia para los diferentes grupos experimentales.

Indicadores	Tratamientos					Control
	Vacuna	Microcápsula vacía	Levadura recombinante no encapsulado	Levadura no recombinante no encapsulada	Levadura no recombinante encapsulada	
% Mortalidad	33,3	89,7	70,0	93,3	86,7	93,3
% RPS	64,3	3,9	25,0	0	7,1	
% RAR	60,0	3,7	23,3	0	6,7	
IC 95% RAR	41 - 79	-10,6 – 17,9	4,7 - 42		-8,4 – 21,8	
NNT	2	28	5		16	
IC 95% NNT	1,3 - 2,4		2,4 - 21,4			

Indicadores calculados en base al grupo control.

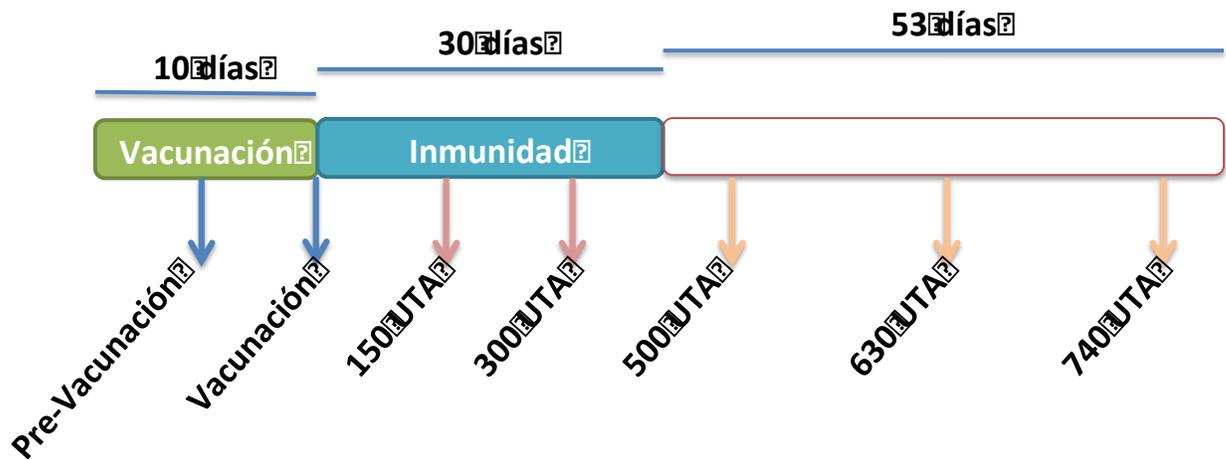


Figura 1. Esquema de muestreo del diseño experimental. Puntos de muestreos del ensayo, en cada punto señalado se obtuvieron muestras de sangre para extracción de suero y riñón anterior para los ensayos de expresión génica.

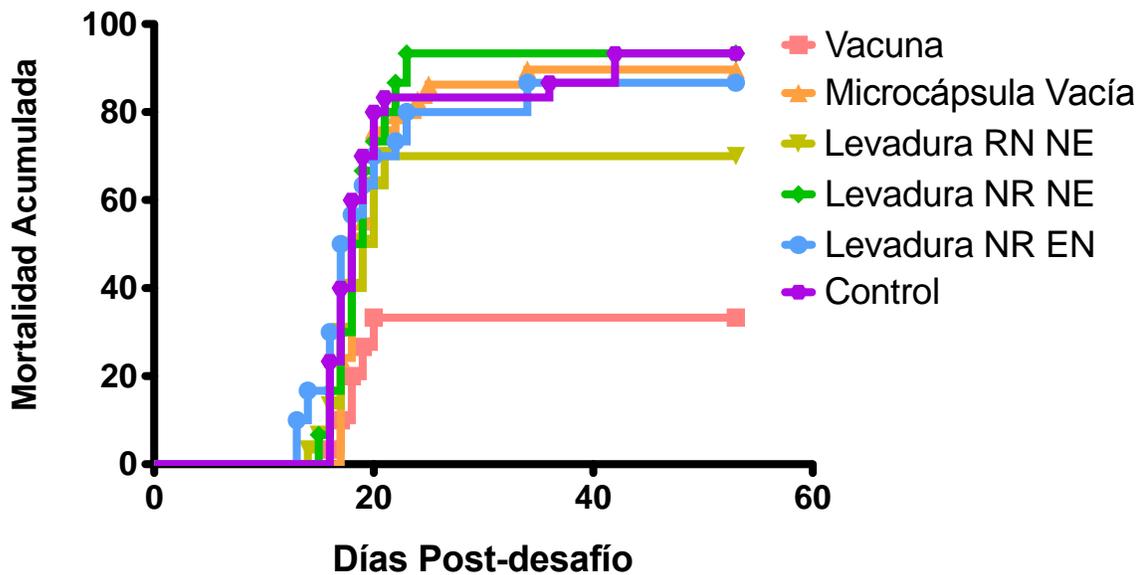


Figura 2. Curva de mortalidad acumulada posterior a la vacunación y subsecuente desafío contra ISAV. Cinco grupos inmunizados con diferentes formulaciones (Vacuna, Microcápsula Vacía, Levadura RN NE, Levadura NR NE, Levadura NR EN) y el grupo control (Alimento comercial más aceite) hasta el día 53 post-desafío por inoculación intraperitoneal. RN: recombinante; NR: no recombinante; EN: encapsulado; NE: no encapsulado.

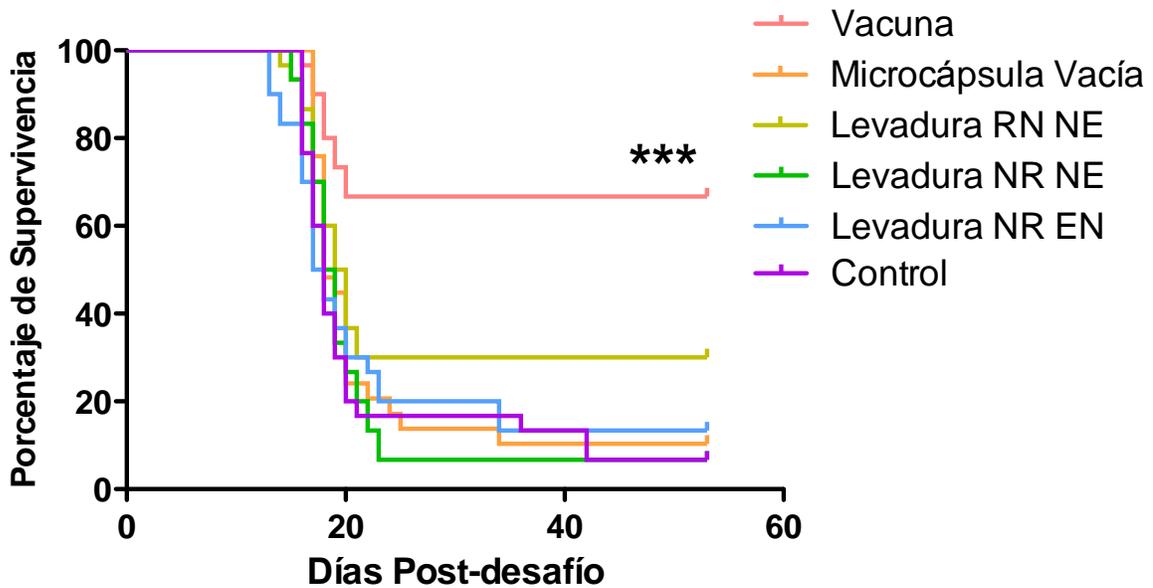


Figura 3. Análisis de Kaplan Meier del porcentaje de supervivencia de los peces tratados y desafiados. Los peces fueron sometidos a los diferentes tratamientos experimentales (Vacuna, Microcápsula Vacía, Levadura RN NE, Levadura NR NE, Levadura NR EN, control) y desafiados contra ISAV mediante inoculación intraperitoneal. La comparación global es estadísticamente significativa (Wilcoxon, *** $P < 0,0001$). RN: recombinante; NR: no recombinante; EN: encapsulado; NE: no encapsulado.

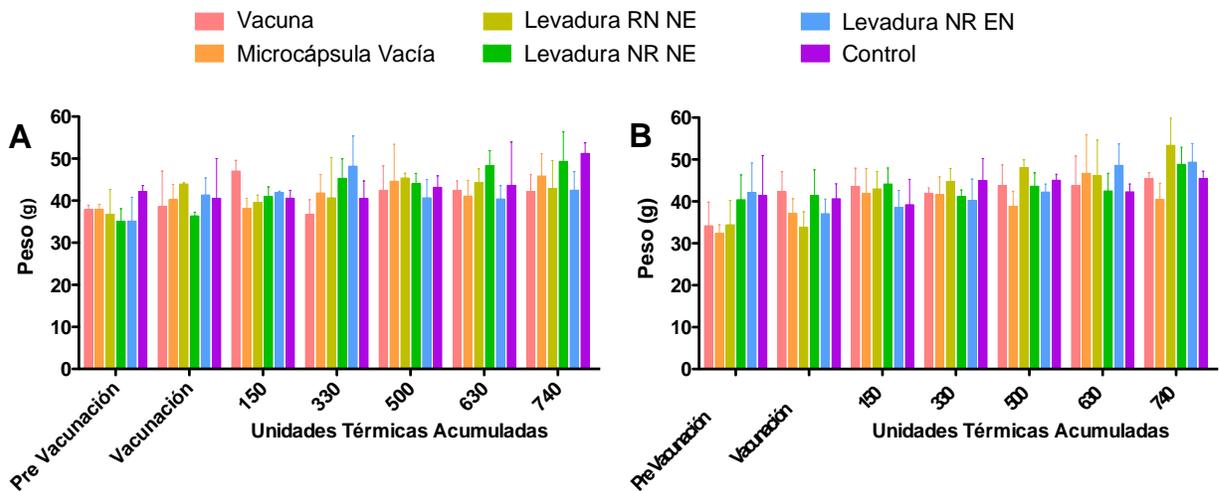


Figura 4. Efecto de los diferentes tratamientos de inmunización oral sobre la ganancia de peso de los peces. Se registraron los pesos de los peces inmunizados con las diferentes formulaciones vacunales a diferentes tiempos. Los peces no vacunados fueron utilizados como control. La información presentada corresponde a los promedios \pm DS de 3 peces por grupo ($n = 55$) en cada tiempo de muestreo. ANOVA y posterior prueba de comparación de Bonferroni en relación al control. No se observan diferencias significativas, tanto en los grupos desafiados (A), como en los no desafiados (B).

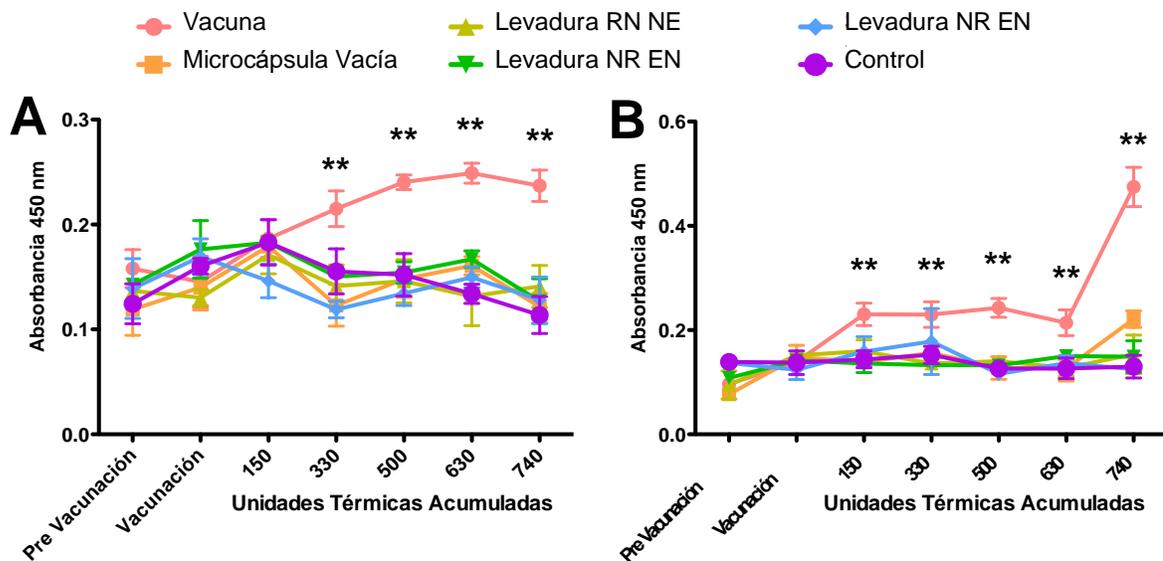


Figura 5. Efecto de los diferentes tratamientos en la respuesta específica anti-ISAV en suero. Los peces fueron inmunizados con diferentes formulaciones (Vacuna, Microcápsula Vacía, Levadura RN NE, Levadura NR NE, Levadura NR EN), además de un grupo control y posteriormente sometidos a desafío a las 450 UTA (B) o no sometidos a desafío (A). Los niveles de IgM específicos para ISAV fueron evaluados mediante análisis de ELISA. La información presentada corresponde a los promedios \pm DS de 3 peces por grupo ($n = 55$) en cada tiempo de muestreo. ANOVA y posterior prueba de comparación de Bonferroni en relación al control. Muestran diferencias significativas sólo para el grupo vacunado tanto en los tratamientos desafiados (A) como en los no desafiados (B) (** $P < 0,001$).

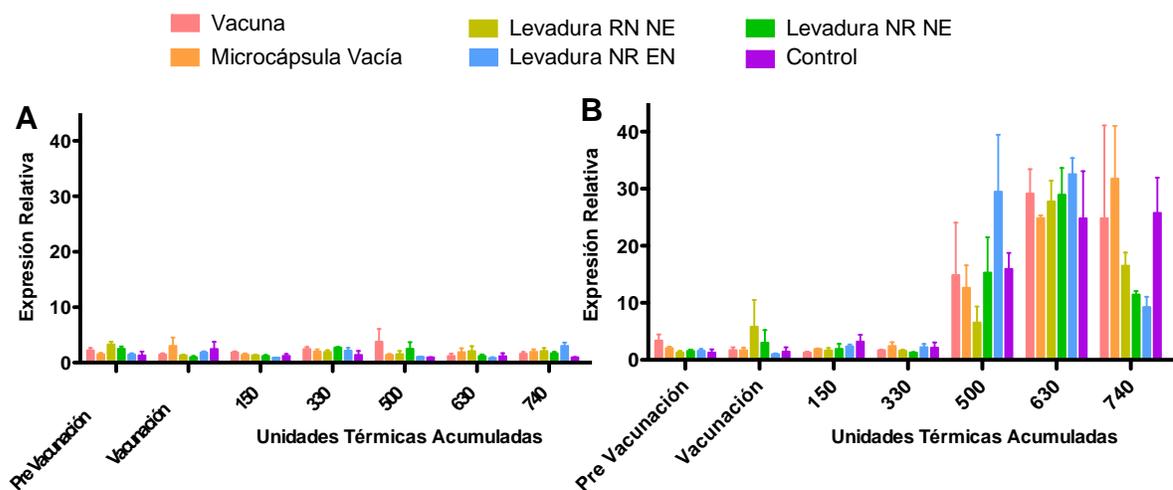


Figura 6. Análisis de qPCR en tiempo real del gen Mx. Se evaluaron los niveles de expresión del gen Mx en el riñón anterior de peces inmunizados con las diferentes formulaciones, no sometidos (A) y sometidos a desafío experimental (B). Los datos corresponden a la media de expresión relativa \pm SD de 3 individuos relativos a 3 controles por punto de muestreo, normalizados por la expresión del factor de elongación 1 α (ELF) y ajustada a la eficiencia de la reacción de PCR. No existen diferencias significativas en la inducción de Mx entre los diferentes tratamientos tanto en los no desafiados ($P = 0,7995$) como en los desafiados ($P = 0,8233$).



Figura 7. Lesiones macroscópicas en salmón del Atlántico afectado por ISAV. Las lesiones externas de los peces necropsiados incluyó exoftalmia, hemorragia del tejido adiposo visceral, estómago, ciegos pilóricos, enteritis hemorrágica, oscurecimiento hepático, además de hepatomegalia y esplenomegalia.

BIBLIOGRAFIA

1. GODOY, MG; AEDO, A; KIBENGE, MJ; GROMAN, DB; YASON, CV; GROTHUSEN, H; LISPERGUER, A; CALBUCARA, M; AVENDAÑO, F; IMILÁN, M; JARPA, M; KIBENGE, FS. 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. 4: 28-41.
2. CLOUTHIER, SC; RECTOR, T; BROWN, NE; ANDERSON, ED. 1995. Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. J. Gen. Virol. 83: 421-428.
3. DANNEVIG, BH; FALK, K. 1995. Propagation of infectious salmon anaemia (ISA) virus in cell culture. Vet. Res. 26: 438-442.
4. FALK, K; ASPEHAUG, V; VLASAK, R; ENDRESEN, C. 2004. Identification and Characterization of Viral Structural Proteins of Infectious Salmon Anemia Virus. J. Virol. 78: 3063-3071.
5. RIMSTAD, E; MJAALAND, S. 2002. Infectious salmon anaemia virus. APMIS. 110: 273-282.
6. SERNAPESCA, Servicio Nacional de Pesca. 2011. Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de la Anemia Infecciosa del Salmón. Resolución Exenta N 1577. Chile.
7. OIE. 2008. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos, 5ª ed. OIE, Paris, Francia.
8. GOMEZ-CASADO, E; ESTEPA, A; COLL, JM. 1999. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. Vaccine 29: 2657-2671.
9. JONES, RM; MACKINNON, AM; SALONIUS, K. 1999. Vaccination of freshwater-reared Atlantic salmon reduces mortality associated with infectious salmon anemia virus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19: 98-100.
10. MIKALSEN, AB; SINDRE, H; TORGERSEN, J; RIMSTAD, E. 2005. Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. Vaccine 23: 4895-4905.
11. VANDENBERG, GW. 2004. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality?. Anim. Health Res. Rev. 5: 301-304.
12. ROBERTSEN, B. 2006. The interferon system of teleost fish. Fish Shellfish Immunol. 20: 172-191.
13. ELLIS, AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol. 25: 827-839.

14. MCBEATH, AJ; SNOW, M; SECOMBES, CJ; ELLIS, AE; COLLET, B. 2006. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 230-241.
15. ZOU, J; SECOMBES, CJ. 2011. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 35: 1376-1387.
16. SAMUEL, CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 778-809.
17. KATZE, MG; HE, Y; GALE, M. 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 675-687.
18. MCBEATH, AJA; COLLET, B; PALEY, R; DURAFFOUR, S; ASPEHAUG, V; BIERING, E; SECOMBES, CJ; SNOW, M. 2006. Identification of an interferon antagonist protein encoded by segment 7 of infectious salmon anaemia virus. *Virus Res.* 115: 176-184.
19. GARCÍA-ROSADO, E; MARKUSSEN, T; KILENG, Ø; BAEKKEVOLD, ES; ROBERTSEN, B; MJAALAND, S; RIMSTAD, E. 2008. Molecular and functional characterization of two infectious salmon anaemia virus (ISAV) proteins with type I interferon antagonizing activity. *Virus Res.* 133: 228-238.
20. ROBERTSEN, B; BERGAN, V; ROKENES, T; LARSEN, R; ALBUQUERQUE, A. 2003. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interferon Cytokine Res.* 23: 601-612.
21. NYGAARD, R; HUSGARD, S; SOMMER, AI; LEONG, JA; ROBERTSEN, B. 2000. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 435-450.
22. JENSEN, I; LARSEN, R; ROBERTSEN, B. 2002. An antiviral state induced in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly I:C. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 367-378.
23. JENSEN, I; ROBERTSEN, B. 2002. Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 221-241.
24. LARSEN, R; ROKENES, TP; ROBERTSEN, B. 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *J. Virol.* 78: 7938-7944.
25. TOBAR, JA; JEREZ, S; CARUFFO, M; BRAVO, C; CONTRERAS, F; BUCAREY, SA; HAREL, M. 2011. Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia. *Vaccine* 29: 2336-2340.

26. NORDMO, R. 1997. Strengths and weaknesses of different challenge methods. *Dev. Biol. Stand.* 90: 303-309.
27. MACWILLIAMS, C; JOHNSON, G; GROMAN, D; KIBENGE, FS. 2007. Morphologic description of infectious salmon anaemia virus (ISAV) induced lesions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* compared to Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Organ.* 78: 1-12.
28. ROMBOUT, JHWM; VAN DEN BERG, AA; VAN DEN BERG, CTGA; WITTE, P; EGBERTS, E. 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp III Systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble or particulate antigen. *J. Fish Biol.* 35: 179-186.
29. ZHANG, YA; SALINAS, I; LI, J; PARRA, D; BJORK, S; XU, Z; LAPATRA, SE; BARTHOLOMEW, J; SUNYER, JO. 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* 11: 827-835.
30. RITCHIE, RJ; MCDONALD, JT; GLEBE, B; YOUNG-LAI, W; JOHNSEN, E; GAGNE, N. 2009. Comparative virulence of Infectious salmon anaemia virus isolates in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish Dis.* 32: 157-171.
31. TOTLAND, G; HJELTNES, B; FLOOD, P. 1996. Transmission of infectious salmon anaemia (ISA) through natural secretions and excretions from infected smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during their presymptomatic phase. *Dis. Aquat. Organ.* 26: 25-31.
32. LAUSCHER, A; KROSSOY, B; FROST, P; GROVE, S; KONIG, M; BOHLIN, J; FALK, K; AUSTBØ, L; RIMSTAD, E. 2011. Immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following protective vaccination against infectious salmon anemia (ISA) and subsequent ISA virus infection. *Vaccine* 29: 6392-6401.
33. KIBENGE, FS; KIBENGE, MJ; GROMAN, D; MCGEACHY, S. 2006. In vivo correlates of infectious salmon anemia virus pathogenesis in fish. *J. Gen. Virol.* 87: 2645-2652.
34. KIBENGE, F; GODOY, M; WANG, Y; KIBENGE, M; GHERARDELLI, V; MANSILLA, S; LISPERGER, A; JARPA, M; LARROQUETE, G; AVENDAÑO, F; LARA, M; GALLARDO, A. 2009. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. *Virol. J.* 6: 88-104.
35. OTERO W, SIERRA F. 2003. Medidas de impacto o magnitud del beneficio de una intervención. *Rev. Col. Gastroenterol.* 18: 46-48.
36. MANSILLA, A. 2002. Tesis. Estudio de seguridad y potencia de una vacuna inyectable para la prevención de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmones del Atlántico (*Salmo salar*), Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.

37. CRISTI, M. 2006. Tesis. Evaluación de la eficacia de dos vacunas experimentales bivalentes para el control de Septicemia Rickettsial del salmón (SRS) y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias.
38. ROMBOUT, JH; TAVERNE-THIELE, AJ; VILLENA, MI. 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio L.*): an immunocytochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 17: 55-66.
39. ROMBOUT, JH; ABELLI, L; PICCHIETTI, S; SCAPIGLIATI, G; KIRON, V. 2010. Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 31: 616-626.
40. SALINAS, I; ZHANG, YA; SUNYER, JO. 2011. Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev Comp Immunol.* 35: 1346-1365.
41. FALK, K; DANNEVIG, B. 1995. Demonstration of a protective immune response in infectious salmon anaemia (ISA) infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Organ.* 21: 1-5.
42. FALK, K; NAMORK, E; DANNEVIG, BH. 1998. Characterization and applications of a monoclonal antibody against infectious salmon anaemia virus. *Dis. Aquat. Organ.* 34: 77-85.
43. KILENG, O; BRUNDTLAND, MI; ROBERTSEN, B. 2007. Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 378-389.
44. WORKENHE, ST; HORI, TS; RISE, ML; KIBENGE, MJ; KIBENGE, FS. 2009. Infectious salmon anaemia virus (ISAV) isolates induce distinct gene expression responses in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage/dendritic-like cell line TO, assessed using genomic techniques. *Mol. Immunol.* 46: 2955-2374.
45. LEBLANC, F; LAFLAMME, M; GAGNE, N. 2010. Genetic markers of the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to infectious salmon anemia virus (ISAV). *Fish Shellfish Immunol.* 29: 217-232.
46. IRWIN, MJ; KAATTARI, SL. 1986. Salmonid B lymphocytes demonstrate organ dependent functional heterogeneity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12: 39-45.
47. HALLER, O; STAEHELI, P; KOCHS, G. 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89 :812-8.
48. TOBAR, J; CONTRERAS, F; BETZ, Y; BRAVO, C; CARUFFO, M; JEREZ, S; GOODRICH, T; DHAR, A. 2010. Oral vaccination against infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*) induces specific immunity and provides protection against infectious salmon anemia virus challenge. World Aquaculture Society Meeting, WAS. San Diego, California.

49. TOBAR, J; CARUFFO, M; BETZ, Y; BRAVO, C; JEREZ, S; GOODRICH, T; DHAR, K. 2010. Oral vaccination against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). XVIII International Conference on Bioencapsulation. Oporto, Portugal.